



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Contenido de glicopeptidolípidos, motilidad y formación de biopelículas en aislados clínicos de *Mycobacterium colombiense*

Milena Maya Hoyos

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Grupo Bioquímica y Biología Molecular de las Micobacterias
Bogotá, Colombia
2013

Contenido de glicopeptidolípidos, motilidad y formación de biopelículas en aislados clínicos de *Mycobacterium colombiense*

Milena Maya Hoyos

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Bioquímica

Director:

Carlos Yesid Soto Ospina, Ph.D., M.Sc., Químico

Línea de Investigación:

Interacción Hospedero- patógeno

Grupo de Investigación:

Grupo Bioquímica y Biología Molecular de las Micobacterias

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2013

*Quiero dedicar este trabajo a Dios por ser mi
fuente de inspiración de amor, felicidad y
vida.*

Agradecimientos

A **Dios y la naturaleza**, por su inspiración de amor, tranquilidad y paz.

A mi **familia** por su apoyo, amor y comprensión siempre.

A **mis amigos**, Jessica, Ximena, Vanessa, Adrián, Pauline, Jimmy, Paola, Martica y Luis por su apoyo incondicional, en especial a Juan Antonio Sanjuán por siempre estar ahí sin importar las circunstancias y apoyarme en todos los aspectos de mi vida.

A **Nicolas** por el tiempo compartido y apoyo.

A **Andrés Felipe Castaño J**, por su colaboración en las fotografías y apoyo constante.

A la **Universidad Nacional de Colombia** por la excelente formación tanto académica como personal.

A la **DIB - Dirección de Investigación Sede Bogotá** por la financiación de la investigación a través del proyecto titulado "ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS, MOTILIDAD Y LA COMPOSICIÓN DE GLICOPEPTIDOLÍPIDOS COMO MEDIDA DEL CARÁCTER INVASIVO DE AISLADOS CLINICOS DE *Mycobacterium colombiense* (Código 14837), avalado en la convocatoria "*Proyectos de Investigación, Desarrollo, Innovación y Creación Artística de la DIB*" en la modalidad 3 de su primer corte.

A **COLCIENCIAS** por la financiación de los estudios de Maestría a través del programa "*Jóvenes Investigadores e Innovadores Virginia Gutiérrez de Pineda*" año 2010.

A la **Dirección Académica Sede Bogotá** por la beca de Asistente Docente del departamento de Química, durante el año 2011 y primer semestre del 2012.

Al **Departamento de Química** de la Universidad Nacional de Colombia por contribuir a la formación académica de Químicos y futuros colegas y por el apoyo económico para la participación en eventos científicos.

A los **Profesores del Programa Maestría en Ciencias–Bioquímica** por sus enseñanzas y aportes a la investigación.

Al Profesor **Carlos Yesid Soto Ospina** por brindarme la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación y por su orientación para el desarrollo de esta investigación.

A la profesora **Elizabeth López** por sus enseñanzas y generar amor y pasión por la bioquímica.

A la profesora **Sixta Martínez**, por sus enseñanzas, amistad y transmitir en mi la pasión por la docencia.

Al **Laboratorio de Microbiología Ambiental y de Interacción Hospedero Patógeno** de la Universidad Nacional de Colombia por la permanente colaboración.

A todos mis **Compañeros grupo de investigación Bioquímica y Biología Molecular de las Micobacterias**.

Y a todos las personas e instituciones que de alguna manera contribuyeron al desarrollo de este trabajo.

MUCHA GRACIAS!!!

Resumen

Mycobacterium colombiense es una micobacteria perteneciente al Complejo *Mycobacterium avium* (MAC), aislada a partir de pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) de la ciudad de Bogotá. *M. colombiense* ha sido relacionada con la producción de linfadenitis e infecciones pulmonares en pacientes inmunodeprimidos y VIH positivos en Colombia, España y Francia [1][2]. Hasta la fecha, las bases genéticas y morfológicas involucradas en el comportamiento fenotípico de las distintas cepas de *M. colombiense* son completamente desconocidas.

En el presente trabajo se ha demostrado por primera vez que *M. colombiense* es una micobacteria motil y con capacidad de formar biopelículas (BP) restringida a cepas con morfología de colonia lisa. Hemos observado que las cepas de *M. colombiense* de morfología lisa contienen en su pared celular glicolípidos con un comportamiento cromatográfico similar a los glicopeptidolípidos (GPLs) de *M. avium*. Una variante natural rugosa de *M. colombiense* (57B) mostró ausencia de motilidad, una reducida capacidad de formar BP y sintetizar GPLs en las condiciones experimentales utilizadas en el presente estudio.

Utilizando diferentes análisis bioinformáticos, se ubicó una agrupación de genes que podrían estar involucrados en la biosíntesis de GPLs en la cepa de referencia *M. colombiense* CECT 3035, cuya secuencia genómica se reportó recientemente. Por último, experimentos de qPCR, sugieren que la transcripción de genes posiblemente involucrados en actividades O-metiltransferasa y glicosiltransferasa podrían estar relacionados en la producción de GPLs de las distintas cepas de *M. colombiense* cultivadas en condiciones planctónicas y de motilidad.

Palabras clave: Complejo *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium colombiense*, motilidad, biopelículas, glicopeptidolípidos.

Abstract

Mycobacterium colombiense is a novel member of *Mycobacterium avium* Complex (MAC) that produces respiratory and disseminated infections especially in immunosuppressed patients [1] [2]. At present, the morphologic and genetic bases involved in the phenotypic features of *M. colombiense* strains are completely unknown. In this study, we show for the first time that *M. colombiense* strains have the ability to biofilm formation and displayed motility restricted to strains with smooth morphology.

In addition, Thin-layer chromatography analysis showed that strains displaying smooth morphology contain glycolipids that migrated as glycopeptidolipids (GPLs). A natural rough variant, *M. colombiense* 57B, displayed absence of motility and impaired capacity of both, biofilm formation and production of lipids with chromatographic behavior similar to GPLs. According to bioinformatic analyses, a gene cluster of GPLs biosynthesis for the recently sequenced *M. colombiense* CECT 3035 strain is proposed. Real-time PCR experiments suggested that transcription of genes possibly involved in methyl and glycosyl transfer activity could be correlated to diversity of glycolipids associated to GPLs in *M. colombiense* strains.

Keywords: *Mycobacterium avium* Complex, *Mycobacterium colombiense*, motility, biofilm, glycopeptidolipids.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de Figuras	XIII
Lista de Tablas	XV
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	XVI
Introducción	1
1. Justificación.....	3
2. Marco Teórico	4
2.1 El Género <i>Mycobacterium</i>	4
2.1.1 Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (MTBC)	6
2.1.2 Micobacterias no tuberculosas (MNT)	7
2.1.3 Complejo <i>Mycobacterium avium</i> (MAC)	8
2.1.4 <i>Mycobacterium colombiense</i>	9
2.2 Envoltura celular de las micobacterias	11
2.2.1 Membrana plasmática	11
2.2.2 Pared celular	13
2.2.3 La cápsula	14
2.2.4 Glicolípidos libres	15
2.3 Los glicopeptidolípidos (GPLs)	15
2.3.1 Estructura de los GPLs	15
2.3.2 Biosíntesis de GPLs	18
2.3.3 GPLs y propiedades de superficie	26
2.3.4 GPLs y su relación con motilidad y formación de biopelículas	26
2.4 Motilidad en micobacterias	27
2.5 Biopelículas en micobacterias	28
3. Hipótesis Experimental	31
4. Objetivos	32

5. Materiales y Métodos	32
5.1 Componente microbiológico y bioquímico	32
5.1.1 Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo	32
5.1.2 Ensayo de motilidad	34
5.1.3 Test colapso de gota	34
5.1.4 Cuantificación de la formación de biopelículas	35
5.1.5 Ensayo con Rojo Congo.....	35
5.1.6 Extracción de lípidos totales.....	36
5.1.7 Análisis de glicopeptidolípidos por cromatografía en capa fina (CCF)	36
5.2 Componente de Biología Molecular y Bioinformática	37
5.2.1 Extracción de DNA por el método CTAB/proteinasa K	37
5.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	38
5.2.3 Electroforesis de DNA en gel de agarosa	39
5.2.4 Extracción de RNA y síntesis de cDNA	39
5.2.5 Búsqueda de genes relacionados con la biosíntesis de GPL	42
5.2.6 Diseño de iniciadores para qPCR.....	43
5.2.7 PCR en tiempo real	45
6. Resultados y Discusión	47
6.1 Morfología colonial de las cepas de <i>M. colombiense</i>	47
6.2 Ensayo de motilidad	50
6.3 Cuantificación de formación de biopelículas.....	58
6.4 Determinación del contenido GPLs en <i>M. colombiense</i> mediante CCF	60
6.5 Búsqueda de genes relacionados con la biosíntesis de GPLs.....	67
6.6 Transcripción de genes relacionados con la biosíntesis de GPLs	71
6.6.1 Aislamiento de DNA genómico de <i>M. colombiense</i> y <i>M. avium</i>	71
6.6.2 Aislamiento de RNA total de <i>M. colombiense</i>	74
6.6.3 Especificidad de cebadores diseñados para qPCR	77
6.6.4 Curvas de calibración y estandarización de condiciones de reacción.....	77
6.6.5 Cuantificación de la transcripción de genes de biosíntesis GPLs	79
7. Conclusiones y perspectivas	88
7.1 Conclusiones	88
7.2 Perspectivas.....	89
8. Divulgación y presentaciones en eventos científicos	911
Anexo A : Componente microbiológico y bioquímico	93
Anexo B: Búsqueda de genes relacionados con la biosíntesis de GPL en <i>M. colombiense</i>.	96
Anexo C: Transcripción de genes relacionados con la biosíntesis de GPLs.....	99
Bibliografía	102

Lista de figuras

	Pág.
Figura 2-1: Representación esquemática de la envoltura celular micobacteriana	12
Figura 2-2: Estructura general de GPLs no serotipo específicos (nsGPL)	16
Figura 2-3: Estructura de GPLs polares o serotipo específicos (ssGPLs) de MAC	17
Figura 2-4: Estructura de GPLs polares de <i>M. smegmatis</i>	18
Figura 2-5: Organización genética del locus de GPL en diferentes micobacterias	20
Figura 2-6: Ruta biosintética de GPLs de <i>M. smegmatis</i>	24
Figura 2-7: Comparación de la ruta biosintética de GPLs	25
Figura 6-1: Pigmentación de las diferentes cepas de <i>M. colombiense</i>	48
Figura 6-2: Morfología colonial de las diferentes cepas de <i>M. colombiense</i>	59
Figura 6-3: Ensayo de motilidad (7H9-OADC-0.35%agarosa) de <i>M. colombiense</i>	50
Figura 6-4: Cinética de motilidad de cepas de <i>M. colombiense</i>	51
Figura 6-5: Comparación de la motilidad entre cepas de <i>M. colombiense</i>	53
Figura 6-6: Modelo explicativo de la acción de GPLs en la motilidad por deslizamiento y formación de BP	54
Figura 6-7: Test colapso de gota	57
Figura 6-8: Cuantificación de biopelículas por el método de cristal violeta	58
Figura 6-9: CCF de extractos lipídicos bacterias en condiciones planctónicas	63
Figura 6-10: CCF de extractos lipídicos bacterias en condiciones de motilidad	64
Figura 6-11: CCF de extractos lipídicos bajo crecimiento planctónico y motil	65
Figura 6-12: Organización genética del locus de GPL en <i>M. avium</i>	72
Figura 6-13: Organización propuesta para el locus de GPL en <i>M. colombiense</i>	72
Figura 6-14: Electroforesis de los productos de extracción de DNA	73
Figura 6-15: Electroforesis de amplificación del segmento JN191386.1	74
Figura 6-16: Electroforesis del RNA extraído de <i>M. colombiense</i>	75
Figura 6-17: Electroforesis de amplificación de JN191386.1. a partir de RNA	76
Figura 6-18: Electroforesis de amplificación del gen 16sRNA a partir de cDNA	77
Figura 6-19: Electroforesis de amplificación de los iniciadores diseñados	78
Figura 6-20: Expresión relativa de genes de locus GPL en condiciones planctónicas	80
Figura 6-21: Expresión relativa de genes de locus GPL en condiciones de motilidad	81
Figura A-1: Tinción diferencial de Ziehl-Neelsen de <i>M. colombiense</i> 10B	93

Figura A-2:	Marcadores de peso molecular usados en la investigación	94
Figura A-3:	Extractos lipídicos totales de <i>M. colombiense</i>	94
Figura A-4:	Perfil cromatográfico del extracto lipídico de <i>M. smegmatis</i>	95
Figura C-1:	Curvas de fluorescencia	99
Figura C-2:	Curvas de Melting	100
Figura C-3:	Curvas de calibración	101

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 2-1: Patrón de ácidos micólicos de algunas micobacterias	14
Tabla 5-1: Cepas bacterianas usadas en el presente estudio	33
Tabla 5-2: Iniciadores diseñados para estudios de niveles de expresión	44
Tabla 6-1: Velocidades de motilidad de cepas de <i>M. colombiense</i>	51
Tabla 6-2: Cuantificación de extractos lipídicos de <i>M. colombiense</i> y <i>M. avium</i>	61
Tabla 6-3: Resumen de características fenotípicas de las cepas <i>M. colombiense</i>	66
Tabla 6-4: Cuantificación y relación de pureza de DNA	73
Tabla 6-5: Cuantificación de cDNA sintetizado de <i>M. colombiense</i>	76
Tabla 6-6: Eficiencias de reacción y temperatura de melting de qPCR	79
Tabla 6-7: Programa de amplificación estandarizado para qPCR	79
Tabla B-1: Resultados BLASTn contra genoma de <i>M. colombiense</i> CECT3035	96

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
-------------	---------

AAR	Ácido alcohol resistentes
Abs	Absorbancia
AG	Arabinogalactano
AM	Ácidos micólicos
BP	Biopelículas
BCG	Bacilo Calmette Guérin
C	Citosina
CCF	Cromatografía en capa fina
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
cDNA	DNA complementario
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
G	Guanina
GPLs	Glicopeptidolípidos
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia

IS	Secuencia de inserción
ITS	Espaciadores intergénicos variables
LAM	Lipoarabinomanano
LB	Medio Luria-Bertani
LM	Lipomanano
LOS	Lipooligosacáridos
<i>M.</i>	<i>Mycobacterium</i>
MAC	Complejo <i>Mycobacterium avium</i>
mAGP	Complejo peptidoglicano-arabionogalactano-ácidos micólicos
min	Minutos
MNT	Micobacterias no tuberculosas
MQ	Agua Milli-Q
MR	Receptor de manosa
MTBC	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nsGPL	Glicopeptidolípidos no serotipo específicos
OD ₆₀₀	Densidad óptica medida a 600nm
ORF	Marco abierto de lectura
P	Valor de la significancia estadística
Pb	pares de bases de DNA
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	fosfatidiletanolaminas
PG	Fosfatidilglicerol
PGL	Fenolglicolípidos

PI	Fosfatidil inositol
PIM	Manósidos de fosfatidil inositol
PL	Fosfolípido
PTG	Peptidoglicano
PVC	Policloruro de vinilo
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
Rf	Factor de retención
RFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción
Rg	Morfología colonial rugosa
RgT	Morfología colonial rugosa transparente
RM	Receptor de manosa
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribosomal
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
seg	segundos
SIDA	Síndrome de inmuno-deficiencia adquirida
SmO	Morfología colonial lisa opaca
SmT	Morfología colonial lisa transparente
ssGPL	Glicopeptidolípidos serotipo específicos
TB	Tuberculosis
TBE	Buffer tris-borato-EDTA
TDM	Dimicolato de trehalosa
TE	Buffer Tris-EDTA

T _m	Temperatura de Fusión
TMM	Monomicolato de trehalosa
TNF- α	Factor necrosis tumoral alpha
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta
V	Voltios
VIH	Virus de inmuno-deficiencia humana

Introducción

El complejo MAC se encuentra ampliamente distribuido en ambientes naturales como agua, suelo, alimentos, animales, humanos, etc. Se conoce que las diferentes especies del MAC hacen parte de biopelículas acuáticas naturales [3][4], lo que expone a humanos y animales a su contagio mediante la inhalación o ingestión de agua contaminada. El incremento de infecciones oportunistas en pacientes infectados con VIH e inmunosuprimidos, ha incrementado la relevancia clínica de las especies pertenecientes al MAC, hasta el punto de ser la causa más común de enfermedad por especies de micobacterias no tuberculosas (MNT) [5][6].

M. colombiense fue originalmente aislada a partir de pacientes VIH positivos de la ciudad de Bogotá, Colombia [7]. Esta especie ha sido responsable de casos de linfadenopatía en niños inmunocompetentes en España y Francia [8][9] y también se ha asociado con infecciones pulmonares que complican casos de fibrosis quística [10]. Recientemente se reportó en Canadá el primer caso de co-infección fatal entre *M. colombiense* y citomegalovirus en una mujer adulta (49 años) [1]. El grado de virulencia de algunas especies de MAC está relacionado con algunos marcadores genéticos y lipídicos, pero hasta la fecha los mecanismos que utiliza el MAC para colonizar las células eucariotas son poco conocidos [11].

Por otra parte, algunas cepas de MAC tienen la capacidad de deslizarse en superficies sólidas hidrofílicas mediante mecanismos independientes de estructuras extracelulares, lo que se conoce como motilidad por deslizamiento [12][13]. Esta forma de motilidad tiene un papel importante y significativo en la colonización de superficies ambientales, e incluso en células del huésped [13], la que también ha sido correlacionada con la capacidad de formación de BP en superficies de PVC y sistemas de agua potable [14].

En cepas de *M. avium*, la motilidad y formación de BP se ha relacionado con la morfología de colonia y la presencia de GPLs en la envoltura celular [15]. Los GPLs, son los principales glicolípidos de la capa más externa de MNT, como *M. smegmatis*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. porcinum*, *M. senegalense*, *M. xenopi*, entre otras.

Se ha reportado que cepas lisas de *M. avium* exhiben alta producción de GPLs y capacidad motil en superficies hidrofílicas, mientras algunas variantes rugosas presentan una motilidad reducida y ausencia de GPLs [12]. Además, algunas cepas de MAC exhiben una variedad de GPLs polares (ssGPLs) generando una variedad de GPLs serotipo específicos (ssGPLs) que permiten distinguir entre diferentes serotipos [16][15].

Se conoce que alrededor de 30 genes participan en la biosíntesis de GPLs. Estos genes son responsables de la síntesis de núcleo peptídico y la cadena de acilo del ácido graso, las modificaciones del núcleo del GPL (glicosilación, metilación, acetilación), el ensamble y exportación a la superficie de la pared celular [17].

En *M. avium*, la acción concertada de una péptido sintetasa (MbtH/PstA/PstB), el sistema sintasa de ácidos grasos (FAS I y FAS II), una policétido sintasa (Pks), una aciltransferasa (PapA3), glicosiltransferasas (GtfA/GtfB/RtfA/GtfD), metiltransferasas (MtfA/MtfB/MtfC/MtfD) y proteínas transportadoras de glicolípidos (Mmps4, MmpL4a, Mmpl4b, MmpL10, Gap) además de otras enzimas, sería responsable de la biosíntesis, modificación y posterior translocación de los GPLs a la pared celular [17] [16].

En el presente trabajo se analizó la motilidad y formación de BP de diferentes cepas de *M. colombiense* y su relación con la composición de GPLs y la morfología colonial. La búsqueda y el análisis de la expresión diferencial de genes relacionados con la biosíntesis de GPLs, especialmente los involucrados en su síntesis y modificación, permitió correlacionar el perfil de GPLs con propiedades fenotípicas en cepas de *M. colombiense*.

1. Justificación

Las MNT son micobacterias cuyo incremento como causante de infecciones oportunistas en pacientes VIH positivos o inmunosuprimidos, especialmente por *M. avium*, ha despertado el interés en el estudio de su persistencia en las células huésped [5][6][18].

Actualmente se conoce que la motilidad de las especies MAC está relacionada con la capacidad de colonizar y persistir en el medioambiente e incluso en células del huésped, siendo un determinante importante para la virulencia [17][13]. Igualmente se ha observado una correlación entre la capacidad de formación de BP en superficies de PVC y sistemas de agua potable con la motilidad, la morfología de colonia y la presencia de GPLs en la envoltura celular de especies del MAC [15].

Al ser *M. colombiense* otra especie del MAC, es muy posible que exista una relación entre la composición de GPLs, la morfología de colonia, la motilidad por deslizamiento y la capacidad de formación de BP en esta nueva especie del MAC, los que podrían estar relacionados indirectamente con la virulencia de las diferentes cepas. La búsqueda de genes relacionados con la biosíntesis y modificación de GPLs y su expresión diferencial, podría permitir correlacionar la producción de GPLs con algunas características fenotípicas de superficie propias de las diferentes cepas de *M. colombiense*.

2. Marco Teórico

Las MNT se encuentran ampliamente distribuidas en el medio ambiente e incluyen un importante grupo de agentes etiológicos de enfermedades producidas tanto en humanos como en animales [18][19][5]. Entre las MNT, se destacan por su virulencia *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum* y en especial las especies del complejo MAC, al ser una de las causas más comunes de infecciones oportunistas alrededor del mundo [20].

La aparición y el aumento de infecciones oportunistas causadas por MNT en humanos, especialmente en pacientes VIH positivos o inmunosuprimidos, ha incrementado el estudio de los mecanismos de persistencia de las MNT en las células huésped [5][6][18]. Los factores de virulencia conocidos de las MNT incluyen componentes de la envoltura celular, enzimas y otras moléculas que actúan como moduladores de la respuesta inmune, las que favorecen la colonización y supervivencia de la micobacteria en los diversos tejidos del hospedero [5].

2.1 El Género *Mycobacterium*

Hacen parte del género *Mycobacterium*, introducido por Lehmann y Neumann en 1896 [21], patógenos muy conocidos como *M. tuberculosis*, *M. leprae* y *M. ulcerans*, que son los agentes etiológicos de la Tuberculosis (TB), lepra y úlceras de Buruli, respectivamente [22]. El género *Mycobacterium* es el único miembro de la familia *Mycobacteriaceae* perteneciente al orden *Actinomycetales* [23].

Actualmente, se cuenta con una completa información de este género en la base de datos “J.P. Euzéby: List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature”, en el que se incluyen hasta abril de 2013, 163 especies y 13 subespecies [21].

El éxito de las micobacterias como patógenos, se basa en su capacidad de residir y proliferar en los macrófagos de las células huésped estableciendo infecciones a largo término [24].

Otra clasificación conocida del género *Mycobacterium*, es la establecida entre micobacterias tuberculosas (Complejo *M. tuberculosis*) y no tuberculosas (MNT). Las MNT son ubicuas en el medioambiente, infectan una gran variedad de hospederos animales y se cree son contraídas desde el ambiente (suelo, agua, polvo, aves, animales, comida). Entre las MNT se encuentran especies del MAC como *M. avium* y *M. intracellulare*, patógenos oportunistas que causan infecciones en ciertos hospederos bajo condiciones inmunológicas especiales [25]. Se ha especulado que una vez han entrado en los pulmones, estas bacterias forman BP de la misma manera como lo hacen en fuentes ambientales, lo que con el tiempo provoca la destrucción de las mucosas [26].

El género *Mycobacterium* está conformado por bacilos de 3-10 μm longitud y 0,3-0,7 μm ancho, y aerobios, aunque algunos de ellos son capaces de crecer en baja concentración de oxígeno [27]. Las micobacterias presentan en su genoma alto contenido de G+C (entre 61 y 71%), no esporulan ni se encapsulan, tienen abundantes gránulos citoplasmáticos y poseen una resistencia mayor a la tinción por los colorantes comunes, pero una vez teñidas son resistentes a la decoloración con una mezcla de alcohol-ácido [25] [28], lo que les brinda su muy conocida característica de ácido alcohol resistencia (AAR) (tinción de Ziehl-Neelsen). Esta resistencia a la tinción se debe principalmente a la riqueza en lípidos de la pared celular, lo que hace a las micobacterias muy hidrofóbicas y les confiere resistencia frente a muchos desinfectantes y agentes químicos [25][29].

La naturaleza química de la envoltura celular dificulta la clasificación de las micobacterias entre bacterias Gram positivas o Gram negativas, por lo que se consideran como Gram indeterminadas. Específicamente, el contenido lipídico de la envoltura micobacterial representa alrededor del 40% del peso seco de la célula, una gran proporción comparada con el 5% que tienen las bacterias Gram positivas y el 10% de las Gram negativas [29]. Sin embargo, análisis taxonómicos las catalogan como Gram positivas [22]; y al observar la organización de la envoltura, se acercan más a las bacterias Gram negativas [29].

Otra característica importante de las micobacterias es su resistencia a los antimicrobianos de amplio espectro [30][31]; sin embargo son sensibles a la estreptomycin que actúa a nivel ribosomal inhibiendo la síntesis de algunas proteínas bacterianas y a la rifampicina que actúa a nivel de síntesis de ácidos nucleicos [32]. También son susceptibles a otros antimicrobianos como la isoniazida (síntesis de ácidos), pirazinamida (actúa como profármaco), etambutol (síntesis de arabinogalactano) y fluoroquinonas (inhibición de la DNA girasa) [30] [32].

Las micobacterias también se han clasificado en dos grandes grupos taxonómicos basados en su velocidad de crecimiento: se consideran micobacterias de crecimiento rápido las que forman colonias en medio sólido en menos de 7 días, como por ejemplo *M. smegmatis*; por otra parte, las micobacterias de crecimiento lento como *M. tuberculosis*, requieren más de 7 días para generar colonias visibles en medio sólido [23] [22].

Las colonias de micobacterias pueden variar desde morfologías lisas a rugosas entre las distintas especies. Los requerimientos nutricionales de las micobacterias son relativamente simples, normalmente estas bacterias crecen en medios de sales minerales simples con amoníaco como fuente de nitrógeno y glicerol como fuente de carbono y donador de electrones en aerobiosis [22].

De acuerdo a su pigmentación, las micobacterias se pueden dividir en tres grupos: las fotocromógenas que forman sus pigmentos por la presencia estricta de irradiación de luz, como *M. kansasii* y *M. marinum*; las escotocromógenas que producen pigmentación incluso en la oscuridad como *M. gordonae*, y las no cromógenas, que no sintetizan pigmentos como *M. tuberculosis* [23]. Anteriormente se definían las micobacterias como microorganismo no motiles, pero se ha mostrado la capacidad de expandirse en medios de cultivos sólidos clasificando su modo de motilidad como un mecanismo de deslizamiento [23].

2.1.1 Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC)

Entre los miembros del MTBC existe una alta identidad genética (superior al 99,9%), lo que sugiere que provienen de un ancestro común. Las micobacterias del MTBC se

caracterizan por tener secuencias 16S rRNA idénticas, pero difieren significativamente en su morfología, bioquímica y hospedero infectado [33] [34]. El complejo MTBC está conformado por las especies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. pinnipedii*, *M. microti* y *M. canetti*, que a pesar de ser organismos muy cercanos a nivel de secuencia de nucleótidos, difieren significativamente en su morfología, bioquímica y hospedero infectado [24][26].

Las micobacterias del MTBC se caracterizan por su capacidad de producir TB y debido a sus características metabólicas y estructurales permanecen por largos periodos de tiempo en estado de latencia sin producir síntomas de la enfermedad. *M. tuberculosis* es el principal agente etiológico de la TB en humanos; *M. bovis* es el agente causal de la TB bovina y precursor de *M. bovis* BCG, bacilo de Calmette y Guérin, usado como única vacuna viva para el control de la TB; por su parte, *M. africanum* es la especie principalmente aislada de enfermos de TB en países africanos [34].

Los miembros del MTBC descritos más recientemente son: *M. pinnipedii* aislado de focas en Australia, Argentina, Uruguay, Gran Bretaña y Nueva Zelanda [35], *M. microti* un patógeno de roedores [36] y *M. canetti*, un patógeno humano inusual [33]. Algunos autores incluyen a *M. caprae* dentro del MTBC, que corresponde a una especie aislada de cabras en varios países de Europa [37], que inicialmente se catalogó como una subespecie de *M. tuberculosis* [38] y después como subespecie de *M. bovis* [39]. *M. caprae* fue finalmente elevada a la categoría de especie en 2003 [40] y se nombró como parte del MTBC, pero actualmente no hace parte del MTBC anotado en la base de datos *Taxonomy* del NCBI[41]

2.1.2 micobacterias no tuberculosas (MNT)

Las MNT están ampliamente distribuidas en el agua, en sistemas de conducción y abastecimiento, tierra, animales domésticos y salvajes, alimentos, entre otros [18]. Los factores de virulencia de las MNT incluyen componentes de su envoltura celular, enzimas y otras moléculas que actúan como moduladores de la respuesta inmune, los que favorecen su colonización y supervivencia en diversos tejidos del hospedero [5].

Es importante destacar, que la incidencia de enfermedades y padecimientos ocasionados por las MNT ha ido en aumento [42] [19]. Hasta el momento no se ha demostrado la transmisión entre persona a persona con MNT, por lo que se ha llegado a considerar que el medioambiente es su principal fuente de infección. Entre los padecimientos causados por MNT figuran la neumonía, linfadenitis cervical, infecciones diseminadas asociadas a deficiencia inmunitaria de tipo celular, enfermedad de Crohn y con menor frecuencia infecciones de piel, osteomielitis, otitis media e infecciones en heridas y en incisiones por donde se insertaron catéteres y trasplantes [19].

Las infecciones debidas a MNT se han relacionado con tasas importantes de morbilidad y mortalidad en individuos con inmunidad celular alterada; se estima que el 50% de los pacientes con SIDA o inmunosuprimidos, son propensos a desarrollar infecciones por MNT, especialmente con especies del MAC (principalmente por *M. avium*) [5].

2.1.3 Complejo *Mycobacterium avium* (MAC)

El complejo MAC es ubicuo en la naturaleza y forma parte del grupo de las MNT [43][44]. Las especies del MAC son microorganismos de crecimiento lento que se encuentran libremente en los ambientes naturales [43][44].

Las especies que componen el MAC son: *M. avium*, *M. intracellulare* [45], *M. colombiense*[7], *M. chimaera* [46], *M. marseillense*, *M. timonense*, *M. boucherdurhonense* [47], *M. vulneris* [48] y *M. arosiense* [49], 4 subespecies de *M. avium* [50] y ciertos aislados designados como “otros-MAC”, que reaccionan con sondas comerciales específicas para MAC (AccuProbe Gen-Probe) pero no reaccionan con sondas específicas de especie, por lo que se clasifican como especies no definidas [51].

M. avium es la especie clínicamente más importante dentro del complejo; aproximadamente el 90 % de los aislados de MAC en pacientes con SIDA corresponden a esta especie [14]. De acuerdo a características fenotípicas y genotípicas, tipo de hospedero, características de crecimiento, pruebas bioquímicas y patogenicidad, *M. avium* se ha dividido en 4 subespecies: *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *silvaticum*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* y *M. avium* subsp. *hominissuis*, siendo esta última la más frecuente en humanos [52] [53].

Las especies de MAC se han reconocido como la principal causa de bacteriemia e infección diseminada en pacientes con SIDA [14]. También se conoce una aparente asociación entre infecciones con MAC y enfermedad en pacientes con patología pulmonar crónica como enfisema y bronquiectasia [43]. Especies del MAC causan linfadenitis e incluso infecciones diseminadas en niños y pacientes con fibrosis quística o anomalías de la pared torácica, [1] [43]. Algunos tratamientos para controlar infecciones por MAC incluyen macrólidos como claritromicina o azitromicina en combinación con etambutol y una rifamicina, mostrando un éxito aproximadamente del 55% pero lamentablemente con altas tasas de recaídas y reinfección [43].

Se han descrito diferentes morfologías coloniales para las cepas MAC: lisa transparente (SmT), lisa opaca (SmO), rugosa transparente (RgT) y rugosa (Rg) [54]. El morfotipo ha mostrado no ser estable, es decir, existe una significativa tasa de conversión de un morfotipo a otro [55]. Algunos estudios demostraron que la frecuencia de transición de la variante SmT a SmO es bastante alta (1 en cada 5×10^4 células), mientras que la transición de SmO a SmT es baja (1 en cada 1×10^6 células) [56].

También se presenta transición de morfotipos liso a rugoso, aunque la transición contraria no se ha observado [57][55][56]. Generalmente, el morfotipo SmT es virulento, SmO no virulento y Rg exhiben virulencia variable [58][59].

Thorel y colaboradores demostraron que existen diferencias sutiles en las cantidades de antígenos entre los morfotipos SmT y SmO; De esta forma, la variante SmT produce polisacáridos en la envoltura celular que no se detectaron en SmO, sin embargo la diferencia en la virulencia no ha sido definida [54].

2.1.4 *Mycobacterium colombiense*

En el año 2006 se aislaron 45 cepas de micobacteria a partir de sangre y esputo de 23 pacientes VIH positivos de Bogotá-Colombia, las que utilizando diferentes métodos moleculares se identificaron como cepas pertenecientes al MAC [7]. Siete de estos aislados fueron propuestos como representantes de una nueva especie denominada *M. colombiense* sp. nov., la que se encontró estrechamente relacionada con *M. avium*.

La nueva especie presentó un nuevo transcrito espaciador interno 16S-23S rRNA (ITS-1) característico, que permitió su caracterización genotípica y clasificación como un nuevo sequevar, el que se denominó MAC-X [7]. Actualmente no se conocen los mecanismos que *M. colombiense* usa para colonizar y persistir en células del huésped. Esta micobacteria ha sido responsable de linfadenopatía en niños inmunocompetentes [8] [9], infecciones pulmonares que complican los casos de fibrosis quística [10] y fatal coinfección diseminada con citomegalovirus [1].

Características fenotípicas como su actividad ureasa y patrón de ácidos micólicos (AM) por HPLC, permitieron la diferenciación de *M. colombiense* de los otros miembros de MAC [7]. Nuestro grupo de investigación reportó recientemente el perfil de AM de *M. colombiense* mediante cromatografía en capa fina (CCF), el que está caracterizado por la presencia de AM I, IV, y VI, junto a dos señales adicionales: la primera (A) con una polaridad entre los AM tipo III y IV de *M. tuberculosis* y *M. avium*, respectivamente; y la segunda (B) un poco más polar que el carboximicolato (VI). De acuerdo con el perfil obtenido y otros análisis, A y B son AM oxigenados que podrían ser específicos para esta nueva especie, lo que todavía necesitaría de estudios estructurales para establecer su identidad química [60].

Nuestro grupo también identificó una región genómica de 634 pb (GenBank: JN191386.1) exclusiva de *M. colombiense*, la que contiene un marco de lectura abierto de 450 pb que codifica para una proteína hipotética de 149 aminoácidos, hasta la fecha sin homólogos en las diferentes bases de datos (GenBankEGT88130.1). Esta proteína hipotética se ha propuesto como un posible marcador molecular útil en la diferenciación de esta especie dentro del MAC [60].

En el 2011, se publicó el genoma de la cepa CECT 3035 de *M. colombiense*, que mostró ser de 5.6 Mb y contener 5230 marcos de lectura. Dicho genoma reportado en la base de datos del NCBI Whole Genome Shotgun (WGS) se encuentra dividido en 18 segmentos (contigs), los que hasta la fecha no se encuentran ensamblados. El genoma de *M. colombiense* es notoriamente más grande que el de *M. avium* (4,8 Mb; 4,400 genes); por alineamiento de secuencias se encontró que las principales diferencias son producidas por grandes inserciones genómicas, que podrían hacer parte de rutas metabólicas

involucradas en la virulencia; sin embargo, se necesitan estudios funcionales para comprobar esta hipótesis [61].

2.2 Envoltura celular de las micobacterias

La envoltura celular de las micobacterias es un conjunto de moléculas que constituyen la interfase entre la bacteria y la célula el huésped, le brinda protección, le da forma y le proporciona mecanismos para el tráfico de sustancias entre el interior y el exterior celular [62]. La gran composición en lípidos de la envoltura celular, la hace impermeable a un gran número de compuestos, una característica en parte responsable de la resistencia intrínseca de las micobacterias a varios de antibióticos [22].

Los principales componentes estructurales de la envoltura son: la **membrana plasmática** similar a la de otras bacterias, la **pared celular** compuesta por lípidos, carbohidratos y tres tipos de moléculas unidas covalentemente: peptidoglicano (PTG), arabinogalactano (AG) y AM, y por último una capa más externa llamada **cápsula**, compuesta de polisacáridos, proteínas y una pequeña cantidad de lípidos [29] (**Figura 2-1**).

Los lípidos y proteínas de la cápsula se han catalogado como moléculas de señalización y efectoras, debido a sus conocidos roles en la interacción con el sistema inmune del hospedero [22]. Finalmente, y aunque no se ha comprobado, las micobacterias al parecer poseen un compartimento entre la membrana y el PTG, el que es análogo al espacio periplasmático de las bacterias Gram negativas [29].

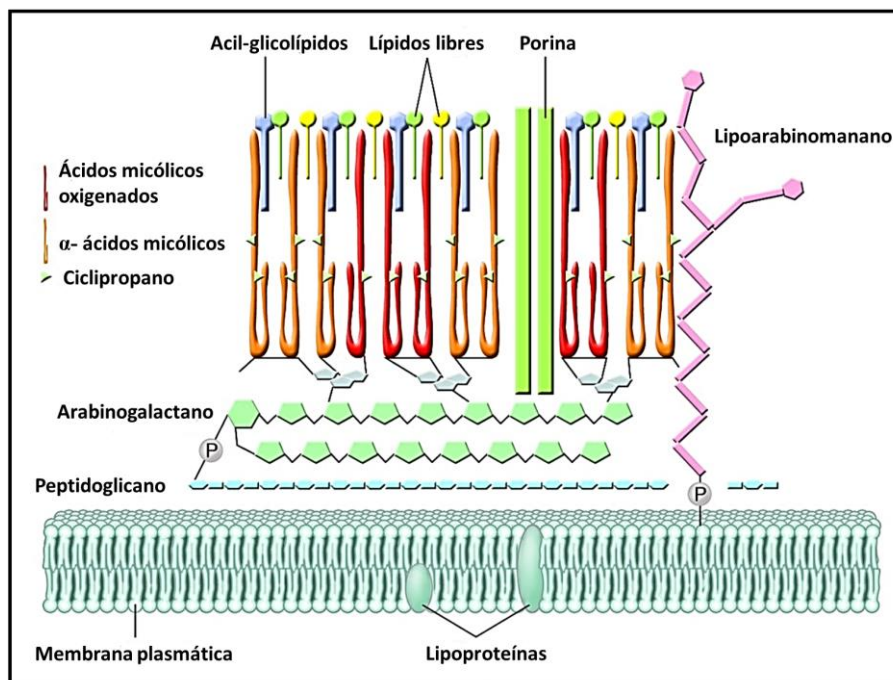
2.2.1 Membrana plasmática

La membrana plasmática tiene como principal función la protección osmótica y el transporte de iones y moléculas [63]. Está constituida por una bicapa lipídica a la que se asocian proteínas y algunos lipopolisacáridos como lipoarabinomano (LAM) y lipomano (LM). LAM es un importante polisacárido, que se encuentra presente en todas las especies de micobacterias, atraviesa toda la envoltura celular y está implicado en el proceso de unión e internalización de las micobacterias al macrófago, a través del receptor de manosa (RM) [29] [64].

Los fosfolípidos (PL) que componen la membrana plasmática de las micobacterias son: manósidos de fosfatidil inositol (PIM), fosfatidilglicerol (PG), cardiolipinas y fosfatidiletanolaminas (PE) [29]. Estos PL intervienen activamente en la interacción entre la micobacteria y la célula huésped, y actúan como adhesinas permitiendo la unión al macrófago por medio del RM facilitando así la fagocitosis [29][67].

La membrana plasmática de las micobacterias posee una gran cantidad de proteínas fundamentales para su viabilidad [65]. Las proteínas de membrana se dividen en integrales y periféricas según la naturaleza de las interacciones membrana-proteína [65]. En la membrana de las micobacterias se han identificado pequeñas proteínas involucradas en el metabolismo [65] y en procesos celulares tales como la unión y transporte de aminoácidos, iones, carbohidratos y ácidos orgánicos [65].

Figura 2-1: Representación esquemática de la envoltura celular micobacteriana. Los componentes de la envoltura celular incluyen la membrana plasmática, la pared celular conformada por PTG, AG y AM. También existen porinas y LAM atravesando toda la pared y envoltura micobacteriana, respectivamente (Tomado de Riley, 2006) [66].



2.2.2 Pared celular

Las micobacterias son resistentes a un gran número de antibióticos debido en gran parte a su compleja pared celular que le confiere ventajas frente a condiciones de estrés, choque osmótico y desecación [22], y sobretodo baja permeabilidad celular [22]. La pared micobacteriana está formada por un esqueleto insoluble (mAGP) formado por la unión covalente entre el PTG-AG-AM y a su vez enlazan otros lípidos y glicolípidos de forma no covalente [67].

En la pared celular existen otros componentes con un alto contenido de manosa como proteínas manoglicosiladas, PIMs, LM, LAM y glicolípidos, que en algunos casos también hacen parte de la cápsula. Estos componentes tienen como función permitir la entrada e interacción con los macrófagos y su concentración se incrementa solo cuando hay interacción con las células huésped [67].

El PTG está compuesto de unidades repetitivas de N-acetilglucosamina unidas al ácido N-acetilglicolil-murámico, que a su vez está conectado a péptidos cortos [29]. El PTG de las micobacterias presenta variaciones en comparación con el de otras bacterias; por ejemplo, los residuos de ácido murámico están N-glicosilados con ácidos glicólicos en lugar de residuos de acetilo, lo que los convierte en excelente diana terapéutica [22]. El AG es un complejo ramificado de heteropolisacáridos constituido por D-arabinano y D-galactano en su forma furanosa, que constituye el principal polisacárido de la pared micobacteriana [22][57].

Los AM son ácidos grasos α -alquilados y β -hidroxilados de alto peso molecular con cadenas hidrocarbonadas largas (C_{70} - C_{90}) que se encuentran en todas las especies de micobacterias [68][29]. La abundante presencia de AM en la pared celular le confiere a la micobacteria un alto carácter hidrofóbico, siendo un determinante de la permeabilidad ya que forma una barrera al flujo de moléculas polares [69]. Los AM se encuentran principalmente esterificando al AG ó esterificando trehalosa para formar dimicolatos de trehalosa (TDM) ó monomicolatos de trehalosa (TMM) y también se han encontrado en forma libre en la pared micobacteriana [22][29].

Se distinguen dos grandes familias de AM: α -micolatos, los cuales no tienen grupo funcional oxigenado y los micolatos oxigenados [70]. Los AM se han clasificado en 7 tipos basados en la clase de ramificación y en la función oxigenada presente. El tipo I son los micolatos no oxigenados de cadena larga (α -micolatos), el tipo II corresponden a micolatos no oxigenados de cadena corta (α' -micolatos), el tipo III son metoximicolatos, el tipo IV son cetomicolatos, el tipo V son epoximicolatos, el tipo VI son carboximicolatos y el tipo VII son ω -1-metoximicolato [71].

Los AM son elementos claves en la estructura celular de las micobacterias, con pocas excepciones cada especie micobacteriana posee una determinada composición de AM razón por la cual han sido considerados marcadores taxonómicos [71]. El patrón de AM de algunas especies bacterianas se presenta en la **Tabla 2-1**.

Tabla 2-1: Patrón de ácidos micólicos de algunas especies del género *Mycobacterium*. [72][60] *AM no caracterizados.

Especie	Patrón de AM
<i>M. tuberculosis</i>	I, III, IV
<i>M. smegmatis</i>	I, II, V
<i>M. marinum</i>	I, III, IV
<i>M. intracellulare</i>	I, IV, VI
<i>M. avium</i>	I, IV, VI
<i>M. colombiense</i>	I, IV, VI, A*, B*

Finalmente, se han encontrado porinas que forman poros hidrofílicos a través de la estructura de la pared celular, que permiten la captación de moléculas polares pequeñas necesarias para la nutrición de las micobacterias [29].

2.2.3 La cápsula

La cápsula, constituye la interfase entre la micobacteria y la célula huésped. La cápsula controla los componentes que pueden alcanzar el interior de la bacteria, le brinda protección del ataque de agentes antimicrobianos y modula la respuesta inmune del hospedero [64].

La composición de la cápsula varía según la especie de micobacteria, y se encuentra constituida principalmente por polisacáridos, proteínas y en menor cantidad lípidos, formando una matriz que se enriquece de lípidos a medida que se aproxima a la pared celular, aunque sus componentes no se encuentran unidos de forma covalente al esqueleto mAGP [73]. Algunos estudios estructurales han mostrado que los polisacáridos mayoritarios de la cápsula son glucano, arabinomano y manano de forma minoritaria se encuentran lípidos como PIM y PI [73].

2.2.4. Glicolípidos libres

Las micobacterias sintetizan una gran variedad de glicolípidos de estructura característica, algunos abundantes y expuestos en la superficie bacteriana [74]. Debido a su efecto inhibitorio sobre las actividades antimicrobiales de los macrófagos y sobre la limfoproliferación, los lípidos libres se pueden considerar como posibles factores de virulencia [74]. Se destacan los fenolglicolípidos (PGL), que se encuentran en micobacterias como en el MTBC, *M. leprae*, *M. marinum*, *M. haemophilum*, *M. ulcerans*, *M. kansasii* y *M. canetti*.

Los lipooligosacáridos (LOS), son antígenos presentes en algunas especies de micobacterias como *M. szulgai*, *M. malmoeense*, *M. gordonae*, *M. kansasii*, *M. canetti*, etc. Algunas características como la inmunogenicidad, la mediación en la unión a micobacteriófagos y la rugosidad de la morfología de colonia son asociadas a la presencia de LOS [68]. Por otro lado, los principales glicolípidos de micobacterias MNT, son los GPLs, que tienen un importante papel en fenotipos de estas especies [15][17].

2.3 Los glicopeptidolípidos (GPLs)

Los GPLs se consideran importantes por su relación con la morfología de colonia, hidrofobicidad, agregación, motilidad por deslizamiento y formación de BP en MNT [75][76].

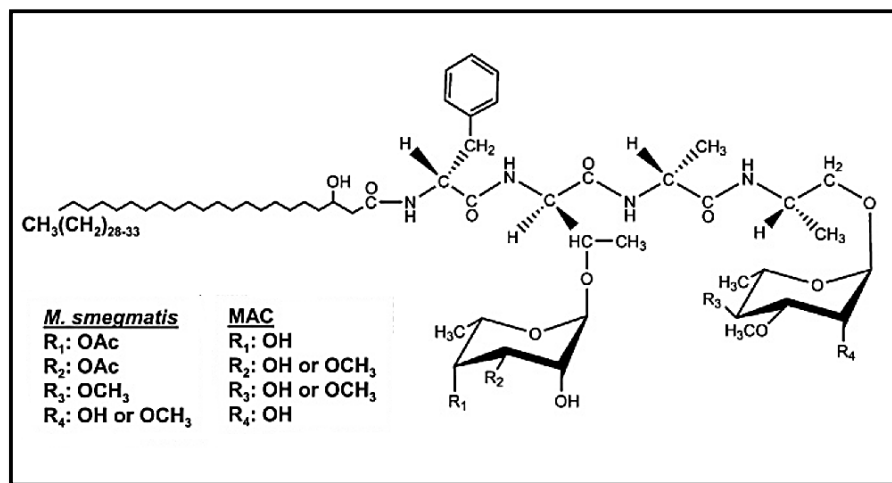
2.3.1 Estructura de los GPLs

La estructura de los GPLs presenta un núcleo lipopéptidico que contiene una mezcla de grupos 3-hidroxil ó 3-metoxi en la cadena hidrocarbonada del ácido graso (C₂₆-C₃₄)

amidada por un tripéptido compuesto de tres aminoácidos inusuales (D-fenilalanina, D-*allo*-treonina, y D-alanina) terminada por L-alaninol (derivado de alanina) [15][57] (**Figura 2-2**). El núcleo lipopéptidico de los GPLs es glicosilado con hexosas no comunes, específicamente el L-alaninol es glicosilado por un residuo α -L-ramnosa. En su estructura, una 6-deoxitalosa se une al hidroxilo de D-*allo*-treonina generando GPLs no serotipo específicos (nsGPLs) presentes en todas las micobacterias productoras de GPLs (**Figura 2-2**) [15][17].

Estos nsPGLs, también pueden estar O-metilados y/o O-acetilados en distintas posiciones dependiendo de la especie; por ejemplo, en cepas de MAC, la 6-deoxitalosa puede ser no metilada ó 3-O-metilada y la α -L-ramnosa es 3-O-metilada o 3,4-di-O-metilada; mientras en *M. smegmatis*, *M. abscessus* y *M. chelonae* la 6-deoxitalosa es 3,4-di-O-acetilada y la α -L-ramnosa es 2,3,4-tri-O-metilado ó 3,4-di-O-metilado (**Figura 2-2**) [15].

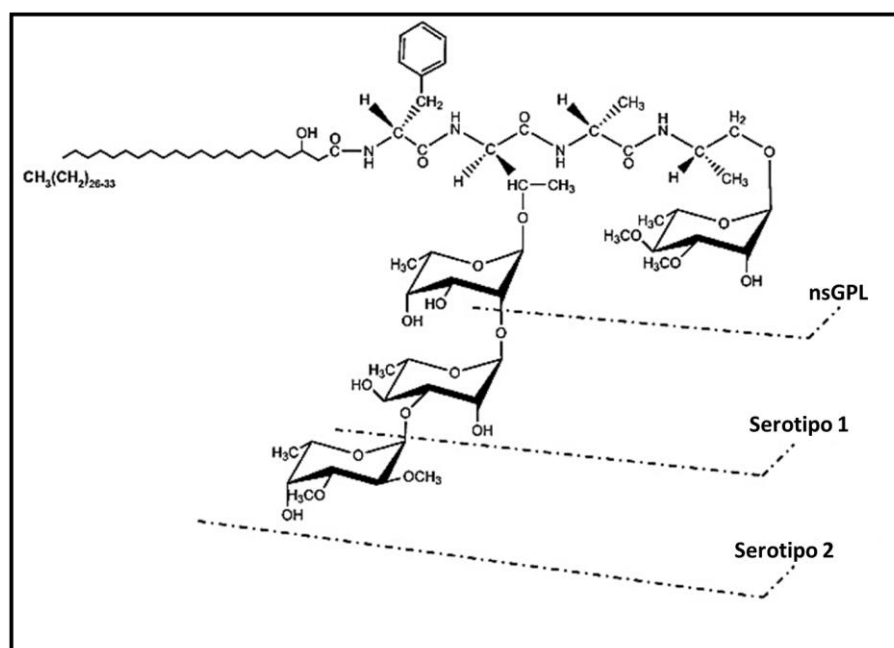
Figura 2-2: Estructura general de GPLs no serotipo específicos (nsGPL) de MNT. Estos nsGPLs comparten la misma di-N-glicosilación en el corazón lipopéptidico pero diferencias en las modificaciones en los residuos de α -L-ramnosa y 6-deoxitalosa. OAc: grupo O-acetilo, OCH₃: grupo O-metilo, OH: grupo hidroxilo (Tomado de Schorey y Sweet, 2008) [15].



Las cepas de MAC también producen una variedad de GPLs polares ó serotipo específicos (ssGPLs), en los que el residuo de la 6-deoxitalosa se prolonga con diversos oligosacáridos que inician generalmente con una α -L-ramnosa, permitiendo así distinguir diferentes serotipos [16][15]. Hasta la fecha, se han reconocido 31 serotipos, pero solo 15 han sido caracterizados a nivel estructural.

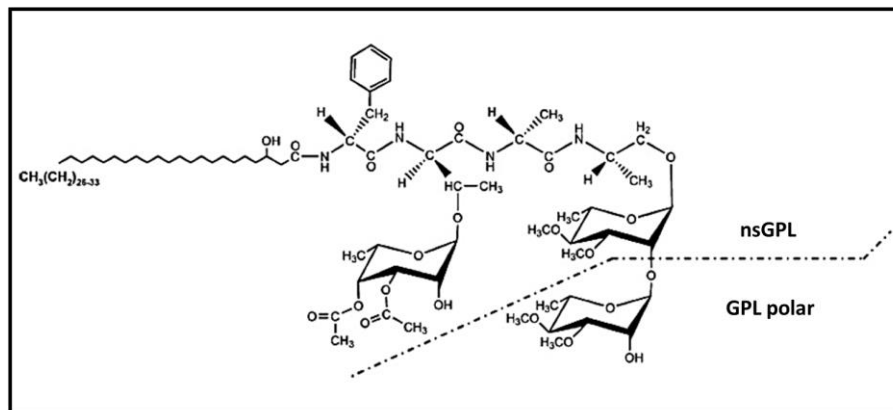
En la **Figura 2-3**, se muestra el serotipo 1 de MAC, que se produce cuando la 6-deoxitalosa es glicosilada por una α -L-ramnosa.; mientras el serotipo 2 corresponde a cepas que producen GPLs que contienen una 2,3-di-O-metil- α -L-fucosa unida a la α -L-ramnosa del serotipo 1 (**Figura 2-3**)[16][57]. La variabilidad estructural y antigenicidad de los ssGPLs, son la base inmunoquímica para la identificación de diferentes serotipos en el complejo MAC mediante seroaglutinación [15].

Figura 2-3: Estructura de GPLs polares o serotipo específicos (ssGPLs) de MAC. Los ssGPLs poseen diferencias en los carbohidratos que extienden la 6-deoxitalosa, que a su vez es la base química para identificación de serotipos de MAC (Tomado de Schorey y Sweet, 2008) [15].



Algunas micobacterias de crecimiento rápido como *M. smegmatis*, *M. abscessus* y *M. chelonae* también producen GPLs polares, que se diferencian de los ssGPLs porque son producidos mediante adición de 3,4-di-O-metil-ramnosa en el primer residuo de α -L-ramnosa vinculada al L-alaninol, mientras el residuo de di-O-acetil-6-deoxitalosa no se extiende con otros oligosacáridos (**Figura 2-4**) [15]. La estructura de estos GPLs polares no varía, por lo tanto, no se consideran serotipo específicos para *M. smegmatis*, *M. abscessus* y *M. chelonae*, pero la producción se favorece bajo determinadas condiciones de crecimiento; por ejemplo, *M. smegmatis* mc²155 produce GPLs polares triglicosilados en condiciones de inanición[15].

Figura 2-4: Estructura de GPLs polares de *M. smegmatis*. Los nsGPLs son modificados con la adición de un residuo de 3,4-di-O-metil- α -L-ramnosa a la 3,4-di-O-metil- α -L-ramnosa adjunta a la L-alaninol, mientras la 6-desoxitalosa es 3,4-di-O-acetilado (Tomado de Schorey y Sweet, 2008)[15].



2.3.2 Biosíntesis de GPLs

Muchos trabajos se han realizado para dilucidar la biosíntesis de los nsGPLs y ssGPLs de *M. smegmatis* y otras MNT [15]. La cepa *M. smegmatis* mc²155 tradicionalmente se ha utilizado para estudiar la ruta biosintética de nsGPLs, debido a que es fácil de manipular en el laboratorio [15]. En 1999, Billman-Jacobe y colaboradores, tamizaron una librería de mutantes por transposición de *M. smegmatis* encontrando una colonia con morfología rugosa que no presentó producción de GPLs como consecuencia de la interrupción en un gen que codifica para una péptido sintetasa [77].

Diversos estudios han permitido identificar genes involucrados en la ruta biosintética de los GPLs, los que se han considerado como posibles nuevas dianas terapéuticas [17]. Alrededor de 30 genes conservados, organizados en grupos y algunos bajo el mismo operón, participan en la biosíntesis de GPLs.

Estos genes son responsables de la síntesis de núcleo peptídico y la cadena acílica del ácido graso, las modificaciones del núcleo del GPL (glicosilación, metilación, acetilación), el ensamble y exportación de GPLs a la superficie de la pared celular [17]. En *M. smegmatis*, el locus que codifica las enzimas involucradas en la biosíntesis de GPLs es compacto y posee un tamaño de 65 Kb que contienen 25 genes aproximadamente [76].

M. abscessus y *M. chelonae*, tienen un locus de GPLs similar al de *M. smegmatis*, pero a diferencia, los genes implicados en la síntesis de la cadena de ácido graso se encuentran distante a los genes involucrados en la síntesis de núcleo peptídico. En cepas MAC, existen genes adicionales para la producción de ssGPLs. Se ha especulado que la organización compacta del locus de GPLs en *M. smegmatis* representa una forma ancestral que ha evolucionado para generar diversos locus presentes en otras MNT [78][17] (**Figura 2-5**).

▪ **Formación del núcleo lipopéptidico de los GPLs**

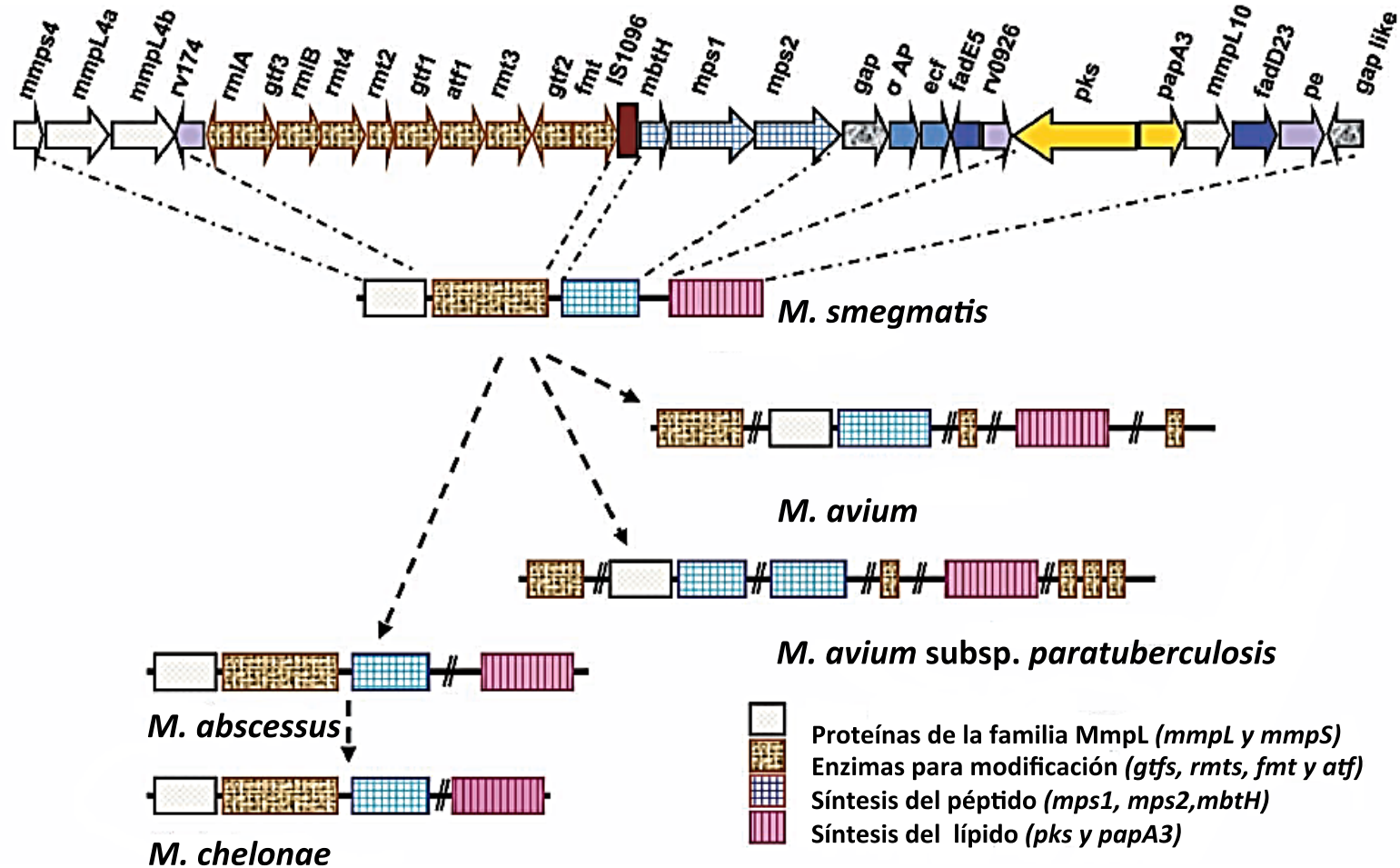
Inicialmente, la cadena del ácido graso sintetizada por el sistema sintasa de ácidos grasos (FAS I y FAS II) (**Paso 1, Figura 2-6**) es extendida y β -hidroxilada por la acción de la policétido sintasa PKs (**Paso 2, Figura 2-6**), [76] y probablemente una Acil-CoA-deshidrogenasa (FadE5) incorpora una insaturación en la posición C_{α} - C_{β} en la cadena acílica del ácido graso.

Finalmente, la cadena alifática es transferida desde la PKs al aceptor lipídico del primer módulo de la péptido sintetasa, con la ayuda de la proteína asociada a PKs llamada papA3 (aciltransferasa) (**Paso 3, Figura 2-6**) [17][76].

En 1999, Billman-Jacobe y colaboradores identificaron el gen *mps*, que codifica un péptido sintetasa no ribosomal, que cataliza la síntesis del residuo peptídico de la molécula [12]. La enzima Mps (codificada por el gen *mps*), es codificada por tres ORFs (Marco abierto de lectura) llamados *mbtH*, *mps1* y *mps2* [79]; aunque la función del gen *mtbH* es desconocida, se conoce puede afectar la formación del núcleo lipopéptidico debido a su posición adyacente a *mps1* [80].

La enzima Mps está compuesta por 4 módulos responsables de la adición secuencial de cuatro aminoácidos al ácido graso; los tres primeros módulos contienen actividad racemasa, que convierte los L-aminoácidos en la forma D-aminoácidos (D-fenilalanina, D-allo-treonina, y D-alanina) y el cuarto módulo incorpora el L-alaninol siendo innecesario la función racemasa, pero contiene un dominio reductasa para la conversión de L-alanina a L-alaninol [77][76] (**Paso 3, Figura 2-6**).

Figura 2-5: Organización genética del locus de GPL en diferentes micobacterias. Se muestran genes que codifican proteínas requeridas para el transporte de GPLs a la superficie; proteínas involucradas en la biosíntesis de azúcares, lípidos y péptidos y de función desconocida (Tomada de Mukherjee y Chatterji, 2012) [76].



El número y organización de módulos en la sintetasa determina el tamaño y la secuencia del péptido [77]. El ensamble del corazón lipopéptidico se inicia con el aceptor lipídico N-acil-fenilalanina, el que es modificado por la adición secuencial de *allo*-treonina, alanina y alaninol mediada por la péptido sintetasa [77]. En *M. avium*, los genes *pstA* y *pstB* tienen la misma función que los genes *mps1* y *mps2* en *M. smegmatis*, que consiste en codificar la péptido sintetasa no ribosomal esencial para la formación del núcleo peptídico [17][76][81] (**Figura 2-7**).

▪ Glicosilación de GPL

Las enzimas GtfA y GtfB han sido identificadas en especies de MAC como responsables de la adición de la 6-deoxitalosa y α -L-ramnosa al lipopéptido respectivamente. En *M. smegmatis* se encontró que los genes *gtf1* y *gtf2* están encargados de las primeras glicosilaciones, los que son funcionalmente equivalentes a *gtfA* y *gtfB* en MAC (**Figura 2-7**) [16]. Gtf3 es la glicosiltransferasa involucrada en la producción de GPLs polares de *M. smegmatis* en condiciones de inanición [15]. Esta enzima tiene como función la adición de 3,4-di-O-metil-ramnosa en la posición 2 del primer residuo de α -L-ramnosa unida al L-alaninol (**Paso 4, Figura 2-6**) [82].

Eckstein y colaboradores (1988) al expresar *rftA* de *M. avium* en *M. smegmatis* obtuvieron la producción de ssGPLs, demostrando de esta forma que *rftA* codifica la ramnosiltransferasa requerida para transferir una ramnosa a la 6-deoxitalosa, primer paso necesario para la generación de ssGPLs (**Figura 2-7**) [83]. Por otra parte, complementación con el gen *rftA* de mutantes *rftA* de *M. avium* restauró la expresión de ssGPL demostrando que la disrupción del gen resulta en inhabilidad de glicosilar la 6-deoxitalosa, pero no el L-alaninol del núcleo lipopéptido [84] [85].

Otras glicosiltransferasas involucradas en la formación de ssGPLs han sido identificadas; por ejemplo, GtfD incorpora el residuo de fucosa para la formación del GPL de serotipo 2 [84][86], GtfTB, adiciona la glucosa esencial para el GPL serotipo 8 [87] y también se han estudiado las enzimas necesarias para la producción de ssGPLs serotipos 3, 4, 7, 9, 12 y 16 [86][76][17][15]. Por ultimo, en el locus de GPL se encuentran los genes *rmlA* y *rmlB* involucrados en la síntesis de los sustratos 6-deoxitalosa y α -L-ramnosa, necesarios para

la producción de nsGPLs, específicamente *rmIA* codifica una putativa glucosa-1-fosfatotimidiltransferasa y el gen *rmIB* una putativa dTDP-glucosa-4,6-deshidrogenasa [77].

▪ Metilación y acetilación de GPL

Diversos estudios han identificado genes responsables de la metilación y acetilación de los GPLs. Patterson y colaboradores (2000), construyeron un mutante por transposición de *M. smegmatis* con interrupción en el gen *rmt3*, que impedía la producción de GPLs metilados [88]. Los autores concluyeron que *rmt3* codifica una 3-O-metil-ramnosiltransferasa indispensable para la metilación posterior de C2 y C4 en la ramnosa.

Jeevarajah y colaboradores (2004) definieron las metiltransferasas que participan en la metilación del hidroxilo del ácido graso y la ramnosa en posiciones C2 y C4 (*fmt*, *rmt2* y *rmt4*, respectivamente)[89] (**Paso 5, Figura 2-6**). Se realizaron estudios de complementación para confirmar homología de metiltransferasas en *M. avium* y se determinó que los genes *mtfB/mtfC* codifican 4-O-metil-ramnosiltransferasa, *mtfD* la 3-O-metil-ramnosiltransferasa y *mtfA* 3-O-metil-transferasa[84][90][89][76] (**Figura 2-7**).

Krzywinska y colaboradores, (2005) produjeron por recombinación homóloga mutantes de *M. avium* deficientes del gen *mtfD*, los que expresaban nsGPLs con residuos de ramnosa sin metilar y no tenían la capacidad de producir ssGPLs [91]; por lo tanto, plantearon la hipótesis que los nsGPLs maduros (metilados) son el sustrato para la formación de ssGPLs [15]. También se determinó que *M. avium* 724 posee una O-acetiltransferasa putativa codificada por el gen *atfA* [16] y estudios de genómica comparativa mostraron que *M. smegmatis* posee un gen *atf* que codifican acetiltransferasas que tienen como función acetilar la 6-deoxitalosa en los carbonos 3 y 4, mientras que en *M. abscessus* y *M. chelonae* este gen se encuentra duplicado [78].

▪ Transporte de GPL

Los GPLs son sintetizados en el citoplasma y su localización final es la capa más externa de la envoltura celular. Algunos estudios han demostrado que proteínas integrales de membrana conocidas como Gap (GPL addressing protein), son requeridas para el transporte de GPLs [79]. De hecho, mutantes producidos por delección en el gen *gap*

producen GPLs al mismo nivel de las cepas silvestres que no son exportados hacia la superficie celular [79].

Por otro lado, Recht y colaboradores construyeron un mutante por transposición del gen *tntpC* (También conocido como *MmpL4b*) de *M. smegmatis* que presentó morfología de colonia rugosa y ausencia de producción de GPLs sugiriendo que la proteína TntpC podría ser responsable de la exportación de GPLs a través de la membrana citoplasmática hacia la superficie de la pared celular [12].

Además, un trabajo reciente demostró que la proteína TntpA (también llamada MmpS4) promueve la biosíntesis y exportación de GPLs, al actuar como un andamio junto con TntpB y TntpC (también nombradas MmpL4a y MmpL4b, respectivamente) para el ensamble del GPL en la membrana [92][17].

▪ Regulación de la síntesis de los GPLs

Kocincova *et al.*, 2008, demostraron la existencia de un gen involucrado en la regulación de la biosíntesis de GPLs [16][93]. Evaluaron mediante CCF los niveles de producción de GPLs en variantes isogénicas de *M. smegmatis*, encontrando que colonias de morfología lisa producían mayores cantidades de GPLs, en comparación con la cepa parental de morfología rugosa. Al analizar la región del operón *mps* en ambas variantes morfológicas detectaron en variantes lisas la secuencia de inserción IS1096 ó ISMsm3 (en las posiciones -78, -87, -201,-88, -137) insertadas en la región promotora del gen *mps*, lo que produjo un aumento en los niveles de expresión de los genes *mps1* y *mps2* [16][93].

Por otro lado, la presencia de la IS1096 (posición +300 y +40) en el gen *lsr2* produjo colonias de morfología lisa [93]. Por tanto, la presencia de IS1096 interrumpe la expresión del gen *lsr2* y la regulación negativa del operón *mps*, lo que favorece la producción de GPLs. Mientras, la inserción de IS1096 ó ISMsm3 en la región promotora del operón *mps* suprime la regulación negativa por Lsr2, aunque el mecanismo por el cual actúa esta proteína aún no es conocido [93].

Figura 2-6: Ruta biosintética de GPLs de *M. smegmatis*. 1: Síntesis de la cadena acílica del ácido graso por el sistema sintasa micobacterial de ácidos grasos (FAS I y FAS II); 2: Extensión y β -hidroxilación de la cadena acílica por acción de la policétido sintasa PKs; 3: Transferencia de la cadena acílica desde la PKs al aceptor lipídico del primer módulo de la péptido sintetasa, con ayuda de la proteína asociada a PKs llamada papA3. 4: Glicosilación de *allo*-treonina por Gtf1 y L-alaninol por Gtf2. Durante la inanición, ocurre una glicosilación en L-alaninol por la acción de Gtf3. 5: Acetilación de 6-deoxitalosa por Atf, O-metilación en la cadena acílica por Fmt y en la ramnosa unida al L-alaninol por Rmts (Tomada de Mukherjee y Chatterji, 2012) [76].

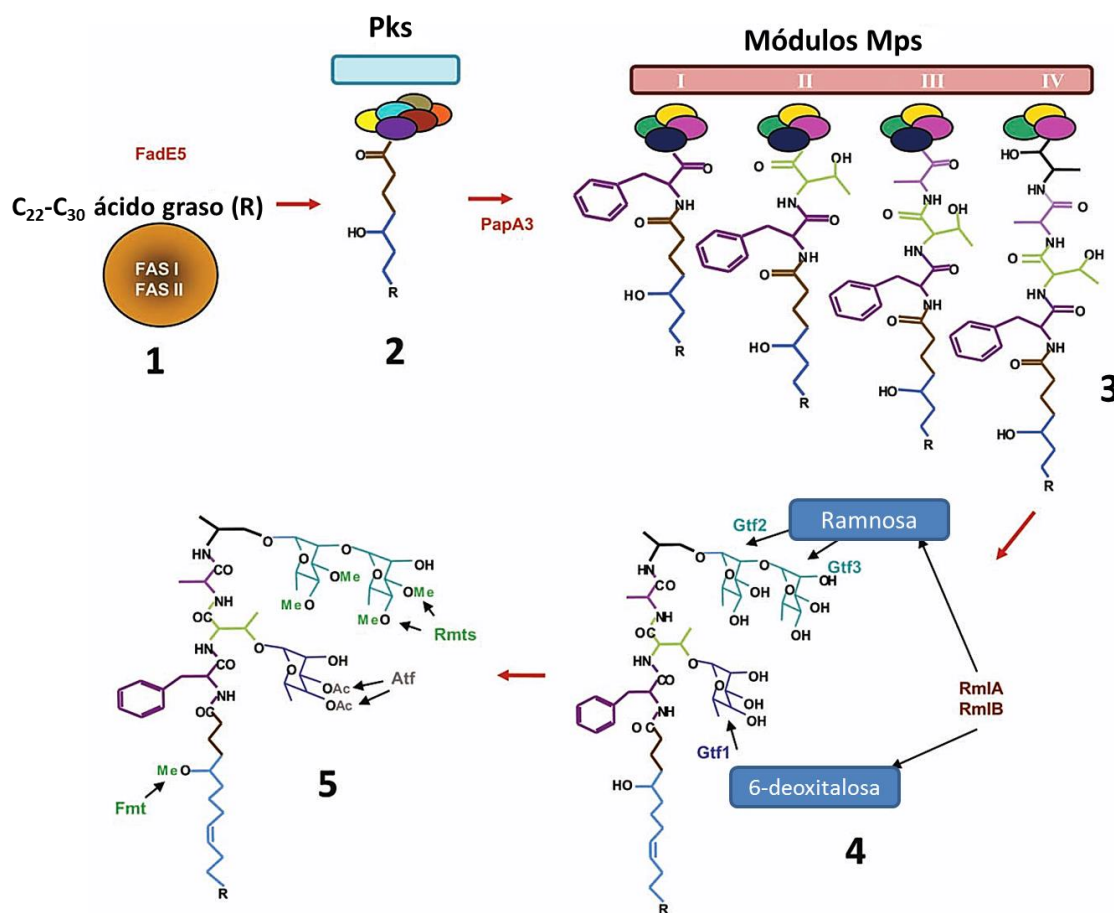
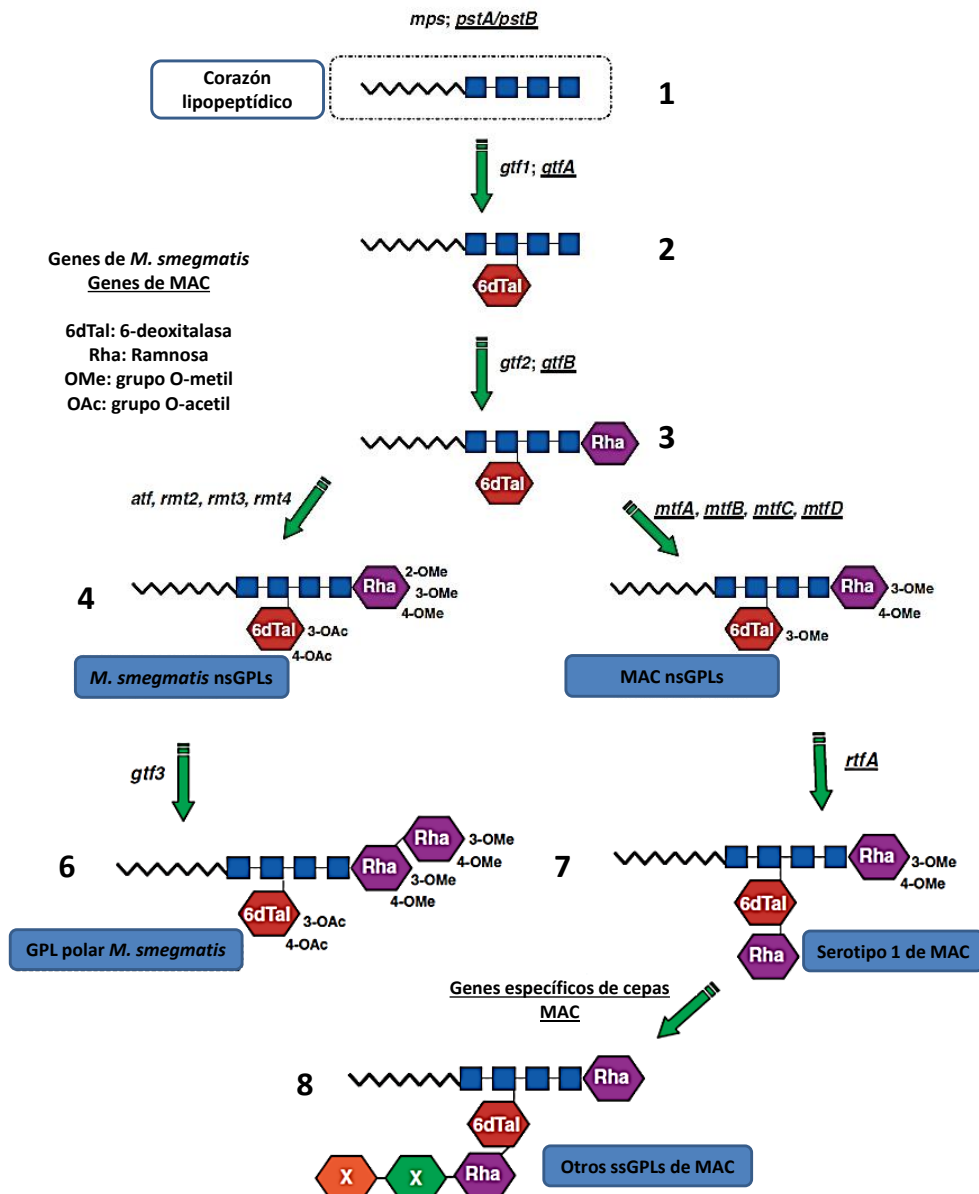


Figura 2-7: Comparación de la ruta biosintética de GPLs entre *M. smegmatis* y especies MAC. Existen diferencias en las modificaciones del GPL para la producción de GPLs polares y ssGPLs. **1:** El gen *mps;pstA/pstB* es requerido para la formación del núcleo lipopéptido del GPL; **2:** Glicosilación de *allo*-treonina por las enzimas Gtf1/GtfA; **3:** Glicosilación del residuo L-alaninol por la acción de Gtf2/GtfB; **4:** Acetilación de 6-deoxitalosa por Atf, O-metilación en la ramnosa unida al L-alaninol por Rmts en *M. smegmatis*; **5:** O-metilación en los residuos de L-ramnosa y 6-deoxitalosa por Mtfs en *M. avium*; **6:** Glicosilación adicional de L-ramnosa en L-alaninol por la acción de Gtf3; **7:** Adición de un residuo de L-ramnosa a la 6-deoxitalosa, primer paso necesario para la generación de ssGPLs y **8:** Otras glicosiltransferasas involucradas en la formación de ssGPLs en cepas MAC (Tomado de Schorey y Sweet, 2008)[15].



2.3.3 GPLs y propiedades de superficie

Micobacterias defectuosas en la biosíntesis de GPLs a menudo tienen alterada la morfología de colonia [15]. En general, cepas deficientes en la producción de GPLs muestran morfología de colonia rugosa, aumento de la hidrofobicidad y agregación celular [94]. Por ejemplo, mutantes de *M. smegmatis* del gen *mps* carecen de GPLs y presentan morfología rugosa [77].

También se ha observado que mutantes de *M. avium* 104 serotipo 1 del gen *gtfA* y *M. smegmatis* del gen *gtf3* ó *atf1* exhiben morfología rugosa y son defectivos en la producción de GPLs [84][95][96]. Sin embargo, cepas con ligeras modificaciones en la estructura del GPL, como el mutante *mtfD* de *M. avium* 104, producen colonias de morfotipo liso. Por tanto autores proponen que existe una correlación tanto en la producción y estructura del GPL con la morfología de colonia [15].

2.3.4 GPLs y su relación con motilidad y formación de biopelículas.

Las micobacterias se consideraban organismos no motiles hasta que Martínez y colaboradores (1999) demostraron que *M. smegmatis* y *M. avium* tenían la capacidad de translocarse en superficies sólidas por mecanismos de deslizamiento independientes de flagelos [13]; una capacidad que a su vez se ha relacionado con la presencia de GPLs y la morfología de colonia [13][15]. En general, variantes de morfotipo rugoso y deficientes en la producción de GPLs muestran una disminución en su capacidad motil en superficies de agarosa [94][12].

Recht y colaboradores (2000) construyeron individualmente por transposición mutantes de los genes *mps* y *tntpC* de *M. smegmatis*, los que mostraron colonias con morfología de colonia rugosa, deficiencia en la producción de GPLs, nula capacidad motil y de formación de BP. Resultados similares han mostrado que mutantes del gen *pstA/pstB* de *M. avium* presentan una disminución en su capacidad para formar BP sobre superficies de PVC [81]. Estos datos sugieren que la presencia de GPLs en la envoltura hace que la superficie de *M. avium* sea más hidrofóbica y de esta forma facilite su interacción con las superficies de PVC.

Otro estudio mostró que una cepa *M. smegmatis* deficiente del gen *atf1* producía GPLs no acetilados, morfología rugosa intermedia y una notable reducción en la capacidad motil y formación de BP [96], lo que sugiere que la motilidad y formación de BP pueden ser afectados por ligeros cambios estructurales en los oligosacáridos del GPL [15]. El mecanismo exacto del efecto del GPLs en esta propiedad sigue siendo desconocido y no hay datos experimentales que apoyen esta interpretación [12][96].

Existe también una correlación entre la formación de BP y la virulencia. Carter y colaboradores (2003) analizaron cepas de *M. avium* aisladas a partir de pacientes con SIDA, y determinaron que los aislados tenían capacidad diferencial de formar BP en superficies de PVC [14]. Por otra parte, la cepa *M. avium* A5 es capaz de translocarse a través de células epiteliales, mientras que en mutantes de esta cepa deficientes en la producción de GPLs y formación de BP exhiben una capacidad de translocación disminuida, lo que sugiere que los GPLs desempeñan un rol fundamental en la invasión de células epiteliales y en la formación de BP [97]. Dadas las importantes contribuciones en la fisiología y patogénesis de MNT, los genes que participan en la biosíntesis y regulación de GPLs podrían ser dianas potenciales para el diseño de medicamentos contra la infección de micobacterias ambientales [17].

2.4 Motilidad en micobacterias

En 1999, Martínez y colaboradores, demostraron que a pesar de ser microorganismos no flagelados ni poseer estructuras proteicas especiales para el movimiento como pilis y fimbrias, las micobacterias exhiben un fenotipo motil mediante mecanismos de deslizamiento [13].

Esta forma de motilidad superficial aparentemente es producida por fuerzas expansivas del crecimiento poblacional junto a propiedades de la superficie celular que reducen la fricción entre las células y el sustrato, resultando en un movimiento lento de una monocapa uniforme de células [98]. Es importante aclarar que este movimiento no se observa en células individuales, a diferencia con otros tipos de desplazamiento superficial como “twitching” “Swarming” o “gliding” [13][98].

Cepas de *M. smegmatis* y *M. avium* de morfología de colonia rugosa carecen de GPLs y no tienen capacidad de deslizamiento, por tanto, existe una fuerte relación entre la composición de GPLs y la motilidad [13]. Algunos autores sugieren que los GPLs estarían vinculados a la cápsula celular a través de la cabeza hidrofílica, exponiendo las cadenas alifáticas del ácido graso del GPL hacia el exterior, logrando así que la superficie bacteriana sea más hidrofóbica y por tanto reduciendo las interacciones con superficies hidrofílicas facilitando la difusión celular en un medio de experimentación como agarosa [12][96].

2.5 Biopelículas en micobacterias

Las BP son comunidades heterogéneas de microorganismos que crecen adheridos en una superficie [99]. Las BP se componen de microcolonias separadas por espacios intersticiales y heterogéneos en términos estructurales, químicos y fisiológicos [100]. En las BP, las células crecen en agregados multicelulares que están recubiertos por una matriz extracelular producida por las propias bacterias [101].

O'Toole y colaboradores han dividido la formación de BP en tres procesos [99]: 1) **La unión a la superficie**, la cual es el resultado de sensor señales ambientales como pH, osmolaridad, concentración de nutrientes entre otros, disparando múltiples rutas que regulan la formación de BP. Muchas de estas rutas activan la expresión de estructuras o moléculas en la superficie celular que permiten la interacción entre sí y con superficies a colonizar. 2) Luego de la unión a superficie los microorganismos se someten a la **adaptación en la vida de la BP** en el que se incrementa la producción de exopolímeros y resistencia a antibióticos y a luz UV. 3) Finalmente **el proceso de liberación de células o cúmulos de BP** posiblemente por la disminución de las condiciones de supervivencia en la BP, aunque es desconocido este mecanismo [99].

Los microorganismos que crecen asociados a BP son fisiológicamente diferentes a aquellos que crecen de modo planctónico. Estas diferencias fenotípicas se manifiestan de varias maneras dependiendo de la especie. *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* asociadas a BP toleran concentraciones diez veces mayores a la concentración mínima inhibitoria de rifampicina e isoniazida, conocidos antituberculosos [102]. En algunas micobacterias patógenas las BP se han asociado con el aumento de la resistencia a antibióticos [102].

La asociación entre las condiciones ambientales y la respuesta fisiológica de las células asociadas a BP no es homogénea en toda su extensión. Las actividades metabólicas junto con los procesos de transporte de masa cambian a medida que la BP se desarrolla [103]. En el caso de las micobacterias, la BP contribuyen a la proliferación y colonización en múltiples ambientes a los que se enfrentan [14].

Las micobacterias no poseen extensiones proteicas que permitan establecer interacciones iniciales con la superficie ni genes asociados a la producción de exopolisacáridos [104], pero se ha encontrado que la expresión diferencial de lípidos y glicolípidos son esenciales para la interacción inicial con la superficie y la maduración hacia BP con estructuras y propiedades que las definen.

Se ha demostrado que la síntesis y procesamiento de GPLs en la cápsula de *M. smegmatis* y *M. avium* son esenciales para establecer interacciones iniciales con las superficies durante la formación de BP [12]. El análisis de mutantes Δmps de *M. smegmatis* [12] y $\Delta pstAB$ de *M. avium* [105], que codifican proteínas involucradas en la síntesis del corazón peptídico del GPL, son incapaces adherirse a la superficies de PVC.

Ojha y colaboradores (2005), observaron una notable variación en los patrones de AM en *M. smegmatis* asociada a BP y en crecimiento planctónico. Las células en BP presentaron un incremento sustancial en producción de AM de cadena corta (C_{56} - C_{68}) [106]. Además, determinaron que la síntesis de estos AM requería la actividad de GroEL1, una proteína de la familia de chaperonas Hsp60 en micobacterias. Un mutante en el gen *groEL1* de *M. smegmatis* resultó incapaz de formar BP maduras pero podía asociarse en superficies de PVC.

Estos mutantes de *M. smegmatis* $\Delta groEL1$ asociadas a BP no presentaron AM de cadena corta (C_{56} - C_{68}) a diferencia de la cepa silvestre bajo las mismas condiciones de crecimiento. Por los resultados obtenidos, los autores propusieron que estos ácidos grasos cortos, podrían tener un papel importante para el desarrollo arquitectural de la BP [104][106], siendo necesario determinar si estos AM están asociados exclusivamente con la superficie celular o pueden ser liberados para formar una matriz extracelular hidrofóbica y favorecer la maduración de la BP [104][106].

3. Hipótesis Experimental

La motilidad es una propiedad común entre bacterias, la que desempeña un papel importante en la capacidad de colonizar y persistir en superficies del medio ambiente y en las células huésped [13]. La motilidad de las MNT tradicionalmente se ha relacionado con la capacidad de formación de BP en superficies de PVC y en sistemas de agua potable [14], siendo esta última de relevancia para la virulencia [81]. Estudios en especies del MAC, han mostrado que la motilidad y formación de BP están correlacionadas con la morfología de colonia lisa y la presencia de GPLs en la superficie celular [15].

Experimentos realizados en nuestro grupo de investigación han mostrado una relación aparente entre la morfología de colonia y la producción de GPLs en *M. colombiense*. Por lo tanto, resulta de mucho interés evaluar la capacidad motil por deslizamiento y formación de BP de cepas de *M. colombiense*, su relación con la morfología y el perfil de GPLs de envoltura celular. La búsqueda de genes relacionados con la biosíntesis de GPLs y el análisis de su expresión diferencial permitiría asociar su producción con propiedades fenotípicas de superficie en cepas de *M. colombiense*.

4. Objetivos

4.1 Objetivo General

Determinar si en la envoltura celular existen glicopeptidolípidos que puedan ser relacionados con fenotipos como la morfología colonial, motilidad y formación de biopelículas en las distintas cepas de *Mycobacterium colombiense*.

4.2 Objetivos Específicos

- Comparar la morfología colonial de aislados clínicos de *M. colombiense* y su relación con la presencia de glicopeptidolípidos en su envoltura celular.
- Relacionar el posible perfil de glicopeptidolípidos con la capacidad de deslizamiento y formación de biopelículas en cepas de *M. colombiense*.
- Buscar genes involucrados en la biosíntesis de glicopeptidolípidos en *M. colombiense*.
- Analizar y comparar la expresión de genes claves en la ruta biosintética de glicopeptidolípidos en cepas de *M. colombiense* cultivadas en condiciones planctónicas y de motilidad.

5. Materiales y Métodos

5.1 Componente microbiológico y bioquímico

5.1.1 Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo

En la **Tabla 5-1**, se muestran las cepas bacterianas usadas en el presente estudio, las que fueron conservadas previamente como stocks glicerizados a -80°C . Las cepas de micobacterias fueron revisadas usando la tinción de Ziehl-Neelsen antes de su uso (**Anexo A, Figura A-1**).

Las micobacterias para los ensayos de BP, extracción de lípidos en condiciones planctónicas y para inoculación en medios sólidos, se cultivaron a 37°C en medio Middlebrook 7H9 (0.14 M NaCl, 0.005 M KCl, 0.01 M Na_2HPO_4 , 0.002 M KH_2PO_4) suplementado con ADC (0.5% w/v albumina de suero bovino, 0.2 % (w/v) dextrosa, 0.085 % (w/v) NaCl, 0.0003 % (w/v) catalasa) y 0.05% (v/v) glicerol, durante 4-5 semanas para bacterias de crecimiento lento ó 3-4 días para *M. smegmatis* mc²155 hasta un $\text{OD}_{600}=0.6-0.8$ aproximadamente (fase exponencial). Para los ensayos de motilidad, las micobacterias se cultivaron en medio 7H9 suplementando con OADC (ADC + ácido oleico 0.05% (v/v)) y solidificado con 0.35% de agarosa (Difco).

Para la extracción de RNA, las micobacterias crecidas en condiciones planctónicas fueron cultivadas en medio 7H9 suplementado con ADC y Tween80 (0,05%) e incubadas a 37°C hasta un $\text{OD}_{600} = 0.6$ aproximadamente; las crecidas en condiciones de motilidad se cultivaron en 7H9-OADC-0.35% agarosa, se incubaron a 37°C durante 4 semanas, y finalmente se recuperaron por lavado con 50 mL H_2O DEPC.

Para la extracción de DNA genómico, las micobacterias fueron cultivadas en el medio de motilidad e incubadas a 37°C durante 4 semanas, luego con ayuda de un asa se transfirieron las micobacterias a un eppendorf que contenía 400 µL de buffer TE 1X.

La morfología de colonia de las cepas de *M. colombiense* se determinó mediante el ensayo de Rojo Congo, en el que las micobacterias fueron cultivadas en el medio 7H10 suplementado con OADC y 100 µg/mL Rojo Congo. El ensayo de formación de BP se desarrolló en microplacas de poliestireno, inoculadas con un cultivo micobacterial en 7H9-ADC crecido hasta un OD₆₀₀=0.6 aproximadamente.

Las micobacterias utilizadas para el test colapso de gota fueron crecidas en placas de motilidad 7H9-OADC-0,35% agarosa durante 5 semanas. *Pseudomonas aeruginosa* fue cultivada en medio Luria-Bertani (LB) a 37°C durante 24 horas y luego en el medio de motilidad incubado a 37°C durante 24 horas como control positivo para esta prueba.

En todos los casos, los medios Middlebrook 7H9-0,35% agarosa, 7H9 y 7H10 fueron esterilizados en autoclave (121°C durante 15 min y 1.5 atm). Los suplementos ADC-OADC se esterilizaron por filtración a través de membranas de 0,22 µm y se adicionaron a los medios cuando han enfriado hasta 45-50°C.

Tabla 5-1: Cepas bacterianas usadas en el presente estudio.

Cepas	Características	Referencia
<i>M. colombiense</i> 10B (CECT 3035), 19B y 57B	co infección VIH	Aislados clínicos
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	Micobacteria saprófita de crecimiento rápido	[107]
<i>M. avium subs hominissuis</i>	Micobacteria no tuberculosa, ambiental y patógeno oportunista <i>M. avium</i> cepa 104	[108]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cepa productora del biosurfactante ramnolípido	ATCC 27853

5.1.2 Ensayo de motilidad

Antes del ensayo, se dispensaron 25 mL del medio 7H9-OADC-0.35% agarosa estéril en placas Petri (9 cm de diámetro) a 65°C y se dejaron reposar toda la noche a temperatura ambiente [13]. Micobacterias crecidas hasta un $OD_{600}=0,6$ ($\sim 2.7 \times 10^5$ UFC) se inocularon cuidadosamente en el centro de la placa de cultivo evitando al máximo la propagación de células desde el punto de inoculación. A continuación, las placas inoculadas fueron secadas en una cabina de flujo laminar durante 30 min, selladas con parafilm® e incubadas a 37°C durante 5 semanas [13]. El esparcimiento de las bacterias se cuantificó permanentemente midiendo el radio del halo de desplazamiento, para así calcular la velocidad de deslizamiento ($\mu\text{m}/\text{día}$) [13].

También se hicieron experimentos de comparación de capacidad motil entre cepas en una misma placa de motilidad. Los ensayos de motilidad fueron desarrollados por triplicado usando *M. avium* 104 como control positivo; diferencias entre los datos experimentales fueron comparados usando *t-student*, una diferencia de $P<0.05$ fue considerada estadísticamente significativa.

5.1.3 Test Colapso de gota

El ensayo se realizó en placas de poliestireno de 24 pozos (Diámetro interno de 15,40 mm; TPP, Switzerland), las que fueron recubiertas con 30 μL de aceite mineral e incubadas por 24 horas a temperatura ambiente [109] antes del ensayo de colapso de gota.

Las bacterias crecidas en dos placas de medio de motilidad durante 4 semanas a 37°C, fueron recuperadas y resuspendidas mediante lavado con 1X PBS (NaCl 0.14 M, KCl 0.005 M, Na_2HPO_4 0.01 M, KH_2PO_4 0.002 M) y luego centrifugadas a 8000 rpm durante una hora para obtener un sobrenadante sin células. Luego se adicionó cuidadosamente en el centro de cada pozo (previamente recubierto con aceite mineral por 24 horas) 20 μL de sobrenadante ó solución control evitando al máximo la propagación de la gota desde el punto de inoculación. Finalmente, después de 1 min las gotas fueron visualizadas [109]. El ensayo se realizó por duplicado a partir de tres experimentos independientes. Como controles se utilizaron agua desionizada, 10% SDS, *M. smegmatis* mc²155 y cultivo de *P. aeruginosa*.

5.1.4 Cuantificación de la formación de biopelículas

La formación de BP fue evaluada por el método de tinción con cristal violeta, reportado anteriormente por Recht y colaboradores (2000), al que se le introdujeron algunas modificaciones [12]. El ensayo se desarrolló en microplacas de 96 pozos (Diámetro interno 6,54 mm; TPP, Switzerland) las que fueron inoculadas con 75 μ l de cultivo micobacterial ($OD_{600} = 0.6$; $\sim 2.7 \times 10^5$ UFC) y 125 μ l de 7H9-ADC, y posteriormente se incubaron a 37°C durante un periodo de 6 semanas [12].

Después de la incubación, la placas se lavaron tres veces con 1X PBS (pH=7,4), se añadieron 200 μ l de 0.1 % (w/v) de cristal violeta y la mezcla dejó incubar a temperatura ambiente durante 30 min. Después de eliminar el exceso de cristal violeta, los pozos se lavaron 3 veces con 1X PBS.

El cristal violeta asociado a la biopelícula se extrajo con 200 μ l de etanol al 96% durante 1 hora [12] y el colorante retenido por las células se cuantificó a 570 nm en un lector Elisa (iMark™ Microplate Absorbance Reader 168-1135 (Bio-Rad, USA)). Para este ensayo se realizaron ocho réplicas a dos duplicados biológicos procesados de manera independiente, utilizando *M. avium* 104 como control positivo. Diferencias entre los datos experimentales fueron comparados usando *t-student*, una diferencia de $P < 0.05$ fue considerada estadísticamente significativa.

5.1.5 Ensayo con Rojo Congo

Este ensayo se realizó en medio 7H10 suplementado con OADC y 100 μ g/mL Rojo Congo, con el objetivo de determinar y observar la morfología de colonia de las cepas de *M. colombiense*. Se dispensaron 25 mL de medio estéril en placas Petri (9 cm de diámetro) a 65°C y se dejaron reposar toda la noche a temperatura ambiente antes del ensayo [110].

En el centro de la placa se inocularon 3 μ L de micobacterias cultivadas hasta un $OD_{600}=0,6$ ($\sim 2.7 \times 10^5$ UFC). Luego las placas fueron secadas en una cabina de flujo laminar durante 30 min, se sellaron con parafilm® y se incubaron a 37°C durante 4-5 semanas. Durante el periodo de incubación se registró la morfología de colonia, clasificando las colonias como: rugosa o lisa, opaca o brillante, con o sin pigmentación [110][95]. El ensayo se realizó por triplicado para cada cepa de *M. colombiense*.

5.1.6 Extracción de lípidos totales

Los extractos lipídicos totales fueron obtenidos utilizando la metodología descrita previamente por Muñoz y colaboradores (1997) [111]. A micobacterias crecidas en condiciones planctónicas y de motilidad (7H9-OADC-0,35% agarosa) se les hizo inicialmente una extracción con CHCl_3 :MeOH (1:2, v/v) en agitación constante a temperatura ambiente durante 48 horas; luego de decantar, se recuperó el filtrado y los detritos celulares se extrajeron nuevamente con CHCl_3 :MeOH (2:1, v/v) a iguales condiciones.

Los extractos orgánicos obtenidos se unieron y se concentraron en rotavapor. Luego se disolvieron en CHCl_3 :MeOH:H₂O (8:4:2, v/v/v), lo que resultó en una partición. Como producto de la partición se formaron dos fases inmiscibles: la fase orgánica inferior (contiene el extracto glicolipídico) y la fase acuosa superior. Se recuperó la fase orgánica, la que se evaporó hasta sequedad y se cuantificó. Finalmente el extracto lipídico se disolvió en CHCl_3 :MeOH (2:1, v/v) hasta una concentración de 20 mg/mL [111].

5.1.7 Análisis de glicopeptidolípidos por cromatografía en capa fina (CCF)

Para el análisis de GPLs por CCF, 10 μL de cada fracción de lípidos (20 mg/mL en CHCl_3 :MeOH) se inocularon en placas de Sílica-Gel 60 (20x20 cm de tamaño y 0,25 mm de grosor, Merck), y la muestra se separó usando como fase móvil CHCl_3 :MeOH:H₂O (65:25:4 v/v/v) [111] en una cámara cromatográfica previamente saturada con el solvente de elución. La cromatografía se dejó desarrollar hasta que el solvente ascendió por capilaridad a 2 cm del borde superior de la placa [111][70].

Los cromatogramas se revelaron con una solución de antrona (Sigma) al 1% en H₂SO₄ concentrado (p/v) y posterior calentamiento a 120°C por 5 min. Los compuestos que contienen azúcares como los GPLs presentan coloración azul [70]. Las CCF se hicieron analizando los extracto lipídicos totales de micobacterias crecidas bajo dos condiciones de crecimiento (planctónico y motil) y el extracto lipídico de *M. avium* 104 fue usado como patrón para las CCF.

5.2 Componente de Biología Molecular y Bioinformática

5.2.1 Extracción de DNA por el método CTAB/proteinasa K

El DNA genómico de *M. colombiense* CECT 3035, 57B, 19B y *M. avium* 104 fue aislado por el método del CTAB-NaCl [112],[113] protocolo que se describe a continuación:

Recuperación de bacterias desde medio sólido

- a. Con ayuda de un asa se transfirieron las micobacterias a un eppendorf que contenía 400 µL de buffer 1X TE (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 7.5)
- b. La mezcla se calentó durante 20 min a 80°C, para inactivar las bacterias y luego se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Lisis celular

- a. Se adicionó 50 µL de lisozima (10 mg/mL), se mezcló con vórtex y se incubó a 37°C por 12 horas.

Remoción de proteínas y contaminantes celulares

- a. Se adicionó 75 µL de una mezcla de 60 µL 10% SDS /15 µL proteinasa K y se mezcló por inversión y se incubó por 10 min a 65 °C.
- b. Se adicionó 100 µL de 5M NaCl y 100 µL de CTAB/NaCl (precalentada a 65 °C).
- c. Se mezcló por inversión hasta que se observó una suspensión blanca y luego se incubó a 65°C durante 30 min.
- d. Se adicionó 750 µL de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se mezcló por inversión cuatro veces y se centrifugó a temperatura ambiente a 12000 rpm durante 10 min.
- e. Se transfirió a un Eppendorf de 2 mL la fase acuosa superior.

Precipitación de DNA y recuperación

- a. Se adicionó 700 µL de 3M acetato de sodio pH 5,5 al sobrenadante.
- b. Se añadió 0.8 volúmenes (600 µL aproximadamente) de isopropanol para precipitar los ácidos nucleicos. Se mezcló por inversión y se incubó a -20°C durante 2 horas.
- c. Se centrifugó a 4°C a 12000 rpm durante 20 min y se descartó el sobrenadante.
- d. Se adicionó al pellet obtenido 1,0 mL de etanol al 70% frío y se mezcló por inversión.
- e. Se centrifugó a 4°C a 12000 rpm durante 15 min y se eliminó el sobrenadante.

- f. Se lavó nuevamente el pellet con 1,0mL de etanol al 70% y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante.
- g. Se repitieron los pasos de lavado con etanol al 70% frío y por último se dejó secar el pellet a temperatura ambiente durante dos horas.
- h. Se resuspendió el pellet en 50 µL de buffer 0.1X TE y se almacenó a -20°C.

Finalmente el DNA fue cuantificado en un NanoDrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific) y su integridad fue comprobada en gel de agarosa al 2% y mediante PCR convencional [113]. Las muestras de DNA deberían estar en una relación $A_{260}/A_{280}=1,8-2,0$, de lo contrario se suponía algún grado de contaminación, para lo que las muestras se sometían a un paso extra de purificación extrayendo nuevamente con cloroformo/alcohol isoamílico [114].

Para verificar la integridad del DNA de *M. colombiense*, se amplificó a partir de las muestras un segmento de 634 pb exclusivo de esta micobacteria identificada en GenBank: JN191386.1. Utilizando los iniciadores J3: 5' TGGCAGCAAAAGCGAAC 3' (directo) y 5' AAAGCGTCGCTTGGTAGC 3'(reverso) [60]. El protocolo de amplificación utilizado comprendió un paso inicial de desnaturalización a 94°C/5 min, seguido de 35 ciclos de amplificación (94°C/1 min- 64°C/30 seg–72°C/30 seg) y un paso de extensión a 72°C/10 min [60]. Los productos de amplificación se corrieron en electroforesis en gel de agarosa al 1,0 % con un marcador de peso molecular de 1 Kb (GeneRuler).

5.2.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La amplificación de los genes analizados en este estudio por PCR se hizo siguiendo el protocolo [115]:

- a. Se agregó a un tubo *ependorf* (cuyo tamaño depende del termociclador a usarse) cada uno de los componentes en las cantidades que permitan alcanzar las concentraciones adecuadas en un volumen final de 25-30 µL el cual se ajusta con agua MQ. Se utilizaron las siguientes concentraciones finales: 2 mM $MgCl_2$, 0,2 mM dNTP's, 1.25 U *Taq* DNA polimerasa (Fermentas), 1X Buffer *Taq* DNA polimerasa, 0,25 µM de cada iniciador y DNA genómico (2-5 ng/µL) en un volumen de reacción de 25 µL. Se mezcló exhaustivamente por pipeteo.
- b. Se centrifugó brevemente para colectar la mezcla en el fondo del tubo.

- c. Se introdujeron en el termociclador y se seleccionó un programa adecuado, que incluye generalmente: una denaturación inicial del molde (5 -10 min a 94°C), 30-35 ciclos de reacción que constan de un paso de denaturación (1 min a 94°C), un paso de anillamiento (30 seg ó 1 min al T_m de los iniciadores), un paso de extensión (1 min por cada 1000 pb a 72°C) y una extensión final (10 min a 72°C).

Nota 1: Se debe incluir un control negativo, que consiste en una reacción adicional con agua en lugar de DNA ó agua en lugar de enzima. También un control positivo, en el cual se adiciona un DNA plantilla e iniciadores probados previamente. [115].

5.2.3 Electroforesis de DNA en gel de agarosa

El DNA extraído o amplificado se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TBE (tris-borato-EDTA) a 100 V con bromuro de etidio (0.5 µg/mL), como se describe a continuación [115]:

- a. Se preparó el buffer TBE y se agregó la cantidad adecuada de agarosa para obtener una solución entre 0,7 y 2,5%, y se disolvió por calentamiento en horno microondas.
- b. Luego se dejó enfriar hasta 55-60°C y se añadió bromuro de etidio (concentración final 0,5 µg/mL).
- c. Luego se vierte la agarosa fundida sobre el molde y se colocó inmediatamente el peine.
- d. Luego de gelificar se retiró cuidadosamente el peine y se colocó el gel en la cámara de electroforesis previamente llena con 1X buffer.
- e. Se adicionó a las muestras de DNA 5X buffer de carga y se sembraron en los pozos del gel.
- f. Luego se conectaron los electrodos y se aplicó 100 V para la separación del DNA.
- g. Finalmente se visualizó el gel bajo luz UV (254 -366 nm).

Nota: se usaron los marcadores de peso molecular GeneRuler 1 kb DNA ladder y 100 bp ladder de Fermentas. En el **Anexo A (Figura A-2)**, se muestra el patrón de bandas de cada uno de ellos [115].

5.2.4 Extracción de RNA y síntesis de cDNA

La extracción de RNA y síntesis de cDNA de *M. colombiense* CECT 3035, 57B y 19B cultivado bajos condiciones planctónicas y de motilidad se realizó usando el método de Trizol®, descrito por Betts, con algunas modificaciones [116], a partir de dos

experimentos independientes de cultivo obtenido en las diferentes condiciones de estudio.

▪ **Extracción de RNA**

El RNA se extrajo a partir de micobacterias cultivadas en 7H9-ADC-0,05% Tween80 hasta un OD₆₀₀ de 0,6 aproximadamente ($\sim 2.7 \times 10^5$ UFC) y a partir del medio de motilidad lavadas con 50 mL H₂O DEPC:

- a. Se tomaron 50 mL de cultivo y se centrifugaron a 7500 rpm por 10 min y se dejaron 5 min a temperatura ambiente.
- b. El pellet de bacterias se lavó cuidadosamente tres veces con 10, 5 y 1,5 mL de H₂O DEPC, después de cada lavado se centrifugó a 7500 rpm por 5 min a temperatura ambiente.
- c. Se descartó el sobrenadante y se dejó 5 min a temperatura ambiente.
- d. El pellet de bacterias se resuspendió en 1 mL de TRIzol (Invitrogen) + 1 µL inhibidor de RNasa y se transfirió a un tubo O-ring de 1,5 mL (Diámetro 10,8 mm y largo 46 mm) conteniendo 500 µL perlas de zirconio – sílice de 0,1 mm.
- e. El tubo O-ring se llevó a un Mini BeadBeater™ (Biospec Products, Bartlesville, OK, USA) para romper células, se utilizó la máxima velocidad por un tiempo de 20 seg, este proceso se hizo seis veces teniendo la precaución de enfriar la muestra a 4°C entre cada pulso.
- f. Se dejaron los tubos O-ring a temperatura ambiente durante 10 min para permitir la disolución de los complejos RNA-proteína.
- g. Las células lisadas se centrifugaron a 13000 rpm a 4°C por 6 min.
- h. El sobrenadante obtenido se transfirió a un tubo eppendorf de 1,5 mL y se agregó 200 µL de CHCl₃ y se mezcló con vortéx durante 40 seg.
- i. Se dejó a temperatura ambiente por 10 min para permitir la partición de la fase acuosa y orgánica.
- j. La mezcla anterior se centrifugó a 13000 rpm por 15 min a 4°C, para separar las dos fases.
- k. Una vez separadas las fases acuosa y orgánica, se tomó la fase superior y se transfirió a otro tubo eppendorf de 1,5 mL y se adicionó 600 µL de isopropanol, y se mezcló por inversión tres veces y se dejó a -20°C toda la noche, para precipitar el RNA.

- l. La mezcla anterior se centrifugó a 13000 rpm por 20 min a 4°C y se desechó el sobrenadante.
- m. El RNA precipitado fue lavado con 1 mL de etanol 80% en agua DEPC y se centrifugó a 13000 rpm por 15 min a 4°C.
- n. Se dejó evaporar el etanol durante 10-15 min dejando el eppendorf abierto en una cabina de flujo laminar previamente irradiada con luz UV.
- o. El pellet de RNA se resuspendió en 30 µL de agua DEPC y se hicieron alícuotas de 5 µL.
- p. La cuantificación de RNA se hizo en el NanoDrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific) utilizando como blanco agua DEPC.
- q. Se comprobó la calidad de RNA (evidencia de rRNAs 23S y 16S) por electroforesis en gel de agarosa al 2,5%.

▪ **Tratamiento de RNA con DNAsa**

Se utilizó la enzima DNase I (RNase-free) #EN0521 de Fermentas para eliminar DNA contaminante en el RNA. El kit contenía un buffer de reacción 10X con MgCl₂ 400 mM, agua tratada con DEPC y DNasa libre de RNasa (1 U/µl). Para hacer digestión del DNA se procedió de la siguiente manera para 20 µL de reacción:

- a. 2 µg de RNA extraído se ponen en un tubo libre de RNAsas junto a 2 µL de buffer de reacción 10X y se completó a 18 µl con agua DEPC.
- b. Se agregó a la mezcla de reacción 2 µl de DNasa (1 U/µl).
- c. Se incubó a 37°C la mezcla anterior por 30 min.
- d. Se adicionó 2 µl de 25 mM EDTA y se incubó a 65°C por 10 min.
- e. Finalmente, se cuantificó RNA purificado con el NanoDrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific) utilizando como blanco agua DEPC.

Para verificar la ausencia de DNA se hizo una PCR convencional. En este ensayo se utilizó como control positivo DNA genómico de *M. colombiense* se amplificó un segmento de 634 pb exclusivo de esta micobacteria identificada en GenBank: JN191386.1, usando los iniciadores J3 como lo descrito en el inciso 5.2.1[60]. Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,0 % utilizando un marcador de peso molecular de 1 Kb (GeneRuler).

▪ Síntesis de cDNA

La reacción se llevó a cabo utilizando el RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit de Fermentas de la siguiente manera:

- a. Se elaboró la siguiente mezcla de reacción: 10 µL de RNA pretratado con DNAsas + 1 µL de random iniciadores (hexámeros) y se incubó a 65°C durante 5 min, con el fin de eliminar estructuras secundarias.
- b. A la mezcla anterior, se adicionó 4 µL de buffer de reacción 5X (250 mM Tris-HCl, 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT), 0,5 µL de inhibidor de RNasa RiboLock™ (20 U/µL), 2 µL de mezcla de 10 mM dNTPs, 1,5 µL de agua tratada con DEPC y finalmente 1 µL de enzima de transcripción reversa RevertAid™ M-MuLV (200 U/µl). El volumen total de reacción fue de 20 µL.
- c. Se mezcló con vórtex para garantizar que quedará en el fondo del tubo.
- d. Se incubó la mezcla por 5 min a 25°C seguido por calentamiento a 45°C por 60 min.
- e. Se finalizó la reacción calentando la mezcla a 70°C por 5 min.
- f. El cDNA obtenido puede ser usado directamente para los ensayos de qPCR [116].

El cDNA obtenido fue cuantificado en NanoDrop 2000c Spectrophotometer y evaluado con una PCR convencional para la amplificación del gen 16S rRNA ribosomal de *M. colombiense* usando los iniciadores: 5'- GAGATAGGCGTTCCTTG TG-3 (Directo) y 5-CTGGACATAAGGGGCATGAT-3 (Reverso) para obtener un amplímero de 209 pb.

Las condiciones de reacción fueron las siguientes: incubación inicial a 94°C por 10 min, 35 ciclos de amplificación (94°C/1 min-58°C/30 seg-72°C/30 seg), un paso final de extensión a 72°C/10 min y enfriamiento a 4°C. Los productos de amplificación se corrieron en electroforesis en gel de agarosa al 1,0 % con un marcador de peso molecular de 100 pb (GeneRuler).

5.2.5 Búsqueda de genes relacionados con la biosíntesis de GPL en *M. colombiense*

Basados en la cercanía filogenética, la ruta biosintética de GPLs descrita para *M. avium* [17][16][76] se utilizó para establecer si en *M. colombiense* existe una ruta biosintética relacionada con la síntesis de estos glicolípidos. La búsqueda de los genes se realizó en *M. avium* 104, utilizando la información disponible en el servidor NCBI:

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP000479.1>) y el actual reporte hecho por Pang y colaboradores (2013) del locus de GPLs en *M. avium* 104 [17].

Para encontrar regiones homólogas, se realizó un BLASTn de cada gen del locus de *M. avium* 104 contra el genoma de *M. colombiense* CECT 3035 usando el programa **genomic BLAST** disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi [117]; dados los tamaños de genes encontrados, se utilizó la herramienta Megablast para buscar resultados más confiables.

El programa nos indicó el porcentaje de identidad, valor E (significancia estadística), puntuación del alineamiento, número de huecos (Gaps), región del genoma donde se encuentra la secuencia homóloga especificando el segmento (contig) y su posición, además que ofrece enlaces con la base de datos “NCBI nucleotide” para obtener información de la secuencia nucleotídica y producto génico de la secuencia homóloga y de esta manera ubicar su locus en *M. colombiense* [117].

Finalmente, una vez se encontraron los genes, se realizó el gráfico correspondiente del cluster génico en donde se especifica la proximidad relativa entre los genes y la ubicación dentro del genoma de *M. colombiense*, de acuerdo al número, posición y orden del segmento como se reporta en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/wgs/?val=AFVW02>.

5.2.6 Diseño de iniciadores para qPCR

Una vez obtenidas las secuencias de los genes de interés en *M. colombiense*, el servidor Primer 3 se utilizó para diseñar iniciadores utilizados en el análisis del perfil transcripcional de genes involucrados en la biosíntesis de GPL's mediante qPCR (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>). Para el diseño de los iniciadores se tuvo en cuenta parámetros como tamaño del iniciador entre 18–20 pb, un tamaño del amplímero de 100– 250 pb y un Tm entre 57-60°C, garantizar que la secuencia diana esté solo una vez en el molde, evitar auto-complementariedad y formación de dímeros de los iniciadores.

Los iniciadores obtenidos se caracterizaron usando los programas Gene Runner y OligoAnalyzer 3.1, para verificar la formación de homodímeros y heterodímeros de iniciadores, hairpins, afinidad del extremo 3', entre otros. Los iniciadores obtenidos se

probaron por medio del programa “*in silico* PCR amplification”. Dicho programa funciona con base en los genomas reportados de diferentes organismos, busca si hay complementariedad entre los iniciadores y predice la longitud de posibles amplímeros en microorganismos cercanos. En la **Tabla 5-2** se muestran las secuencias de los iniciadores diseñados, el tamaño del amplímero, concentración de GC y Tm.

Tabla 5-2: Iniciadores diseñados para estudios de niveles de expresión de genes involucrados en la biosíntesis de GPLs. * Gen de referencia para el proceso de qPCR.

Gen	Iniciador (5'→3')	Tamaño	Tm	%GC	Amplímero
<i>pstA</i>	D:ACAGGGCACGAGGAATTCTA	20	59.69	50	197
	F:TAGTCCTCGGAGGCTTCGTA	20	59.97	55	
<i>gtfA</i>	D:ATGTGTGCTGGCCAGTTATG	20	59.60	50	212
	F:GGAAGAACGACGTCCAGAAG	20	59.84	55	
<i>rtfA</i>	D:GACTTTTGGAGCGACGAGTT	20	59.48	50	182
	F:GCCAAATCCTGGTAAAGCTG	20	59.71	50	
<i>mtfB</i>	D:GGACACCGAGCACTACGAG	19	59.43	63.16	213
	F:TCATACAGATCGCCATCCAG	20	59.63	50	
<i>mtfC</i>	D:ACAAGGCGGATAAAGGGATT	20	59.80	45	200
	F:CTCATACAGATCGCCATCCA	20	59.63	50	
<i>mtfD</i>	D:TACCTGCTCGACACCTTCG	19	59.99	57.89	203
	F:TCGACCTGCTCGAGTGTCT	19	59.70	57.89	
<i>tmtpC</i>	D:TTCATTCGGGATACCAGGAG	20	59.89	50	203
	F:TTGATCCTGACCCGAAGTTT	20	59.53	45	
<i>tmtpA</i>	D:CTCTCGGCTTTGACGACAC	19	59.56	57.89	182
	F:ATGGCCGACATCAGCTACTT	20	59.72	50	
<i>tmtpB</i>	D:GAGTGCCCTTGAGTGATTCC	20	59.66	55	207
	F:CCTCCAAGAATGACGATTCC	20	59.48	50	
16S rRNA*	D: GAGATAGGCGTTCCCTTGTG	20	59.69	55	206
	F: CTGGACATAAGGGGCATGAT	20	59.77	50	

La especificidad de los iniciadores diseñados fue comprobada mediante PCR convencional utilizando como molde DNA genómico de *M. colombiense*. Las condiciones de reacción utilizadas para la amplificación de los genes fueron: incubación inicial a 94°C por 10 min, 35 ciclos de amplificación (94°C/1 min- 58°C ó 60°C/30 seg-72°C/30 seg) y un paso final de extensión a 72°C/10 min y enfriamiento a 4°C.

Las condiciones de amplificación fueron estandarizadas variando el T_m entre 58°C y 60°C, según el iniciador probado. Los iniciadores se obtuvieron a partir de un servicio privado (Empresa Biodan Colombia SAS), los que fueron resuspendidos en buffer 1X TE para generar stocks de 100 µM.

5.2.7 PCR en tiempo real

Para evaluar los niveles de transcripción de los genes involucrados en la biosíntesis de los GPLs, se utilizó la técnica de cuantificación relativa mediante qPCR, utilizando como gen de referencia *rrs* (16sRNA). Las reacciones se realizaron utilizando cDNAs de las cepas 10B, 19B y 57B de *M. colombiense* obtenidos a partir de bacterias cultivadas en condiciones planctónicas y en medio de motilidad.

La cuantificación se realizó en el equipo CFX96™ Real-Time PCR Detection System (BioRad) y el software empleado por el equipo es Bio-Rad CFX Manager Version 1,6. Se usó el kit Express SYBR® GreenER™ qPCR Supermix Universal (Invitrogen); las mezclas de reacción fueron elaboradas añadiendo 1 µL de cDNA (ó 1.0 µl de dilución de DNA de *M. colombiense* 10B (CECT3035) para las curvas de eficiencia), 2,5 µL de Express SYBR® Green ER™ Universal (Invitrogen), 0,25 µL de cada cebador (Concentración final 0.5 µM) y 1 µL de agua DEPC para completar un volumen de 5 µL de reacción. En todos los casos las cuantificaciones se realizaron por cuadruplicado cada muestra ó punto en la curva de eficiencia y se incluyó un control negativo sin cDNA/DNA por triplicado.

El programa de Real-Time empleado para los genes analizados fue: 95°C por 5 min, 40 ciclos de 95°C por 10 seg, 58°C por 10 seg y 72°C por 15 seg. Al final de cada PCR se realizó una curva de melting de 72°C a 95°C con incrementos de 0,5°C cada 5 seg (rampa ajustada automáticamente por el equipo).

Las curvas de eficiencia de reacción de los genes de estudio se realizaron empleando diluciones seriadas (1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10000) de DNA de *M. colombiense* 10B como muestra de referencia, al ser la cepa tipo CECT 3035, cuyo genoma está reportado en la base de datos del NCBI Whole Genome Shotgun (WGS).

Luego de obtener eficiencias de amplificación cercanas a 2,0 y buena especificidad en las curvas de melting para todos los genes de estudio, se procedió a cuantificar la expresión de los genes en las diferentes muestras de cDNAs mediante el método $\Delta\Delta C_t$. Para la cuantificación los cDNAs se llevaron a concentraciones entre 30-35 ng/ μ L para garantizar que se parte de la misma cantidad. Para comparar la significancia estadística entre los diferentes experimentos en los que se evaluó la transcripción de los genes de estudios por qPCR, se utilizó la prueba estadística *t Student*. Una diferencia de $P < 0.05$ fue considerada estadísticamente significativa.

6. Resultados y Discusión

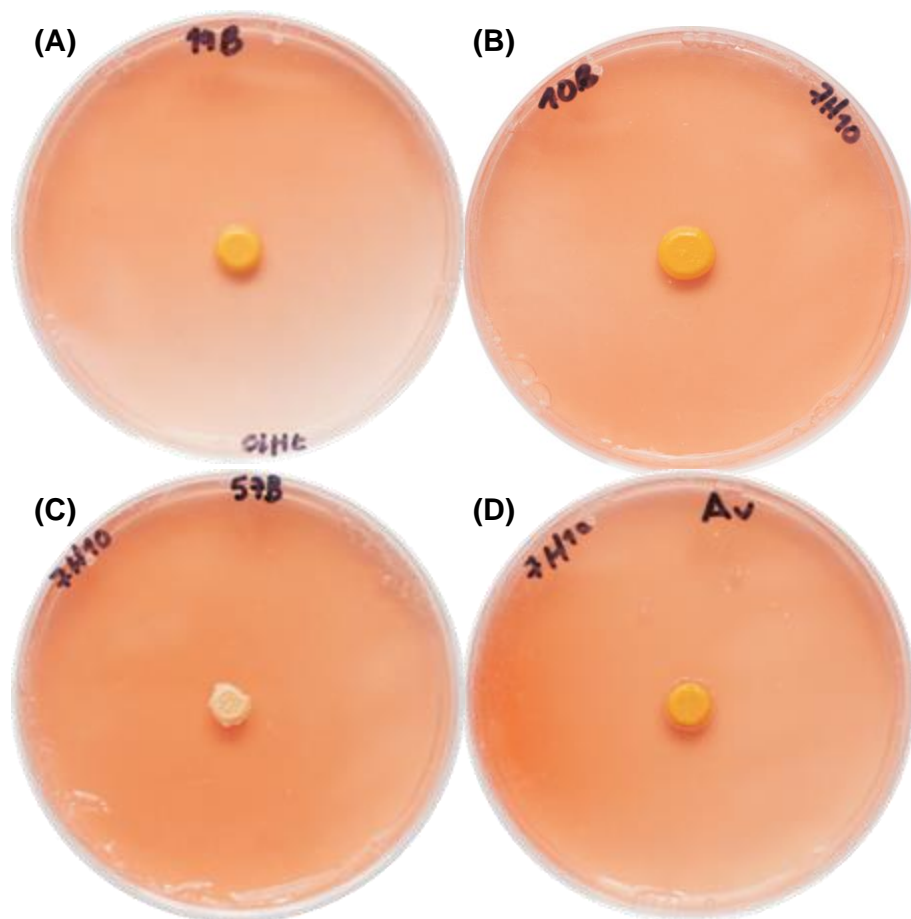
6.1 Morfología de colonia de cepas de *M. colombiense*

Al crecer las cepas de *M. colombiense* en 7H10-OADC suplementado con Rojo Congo (100 µg/mL), se observaron básicamente dos tipos de morfología colonial: colonias lisas brillantes de coloración amarilla (cepa 19B y la cepa de referencia 10B ó CECT 3035) y colonias rugosas, ásperas, secas y opacas (cepa 57B) como lo ilustrado en las figuras **Figura 6-1** y **Figura 6-2**. Ambos fenotipos liso y rugoso se mostraron constantes con el tiempo, luego de repetidos cultivos durante el desarrollo del trabajo (2 años) se mantuvieron siempre estables.

Las cepas de *M. colombiense* con morfología lisa (10B y 19B) desarrollaron pigmentación amarilla cuando las células alcanzaron la fase estacionaria en condiciones estándar de cultivo en los medios 7H9-ADC, de motilidad (7H9-OADC-0.35% agarosa) y de Rojo Congo (7H10-OADC-100 µg/mL Rojo Congo). Contrario a este comportamiento, la variante rugosa (57B) se mantuvo de color blanco-crema al ser cultivada bajo las mismas condiciones experimentales, lo que demuestra deficiencia en la producción de pigmentación en comparación a las demás cepas de *M. colombiense* (**Figura 6-1** y **Figura 6-2**).

Como se mencionó anteriormente, las cepas del MAC al crecer en medio sólido exhiben diferentes morfologías de colonia [54]. Las diferentes investigaciones han mostrado una tasa significativa de transición entre morfotipos coloniales lisos [55]; por ejemplo, se ha observado una frecuencia alta de transición de SmT a SmO, pero una menor frecuencia de SmO a SmT [56].

Figura 6-1: Pigmentación de las diferentes cepas de *M. colombiense*. (A) Cepa 19B; (B) Cepa 10B; (C) Cepa 57B y (D) *M. avium* 104 crecidas en 7H10-OADC- 100 µg/mL Rojo Congo.



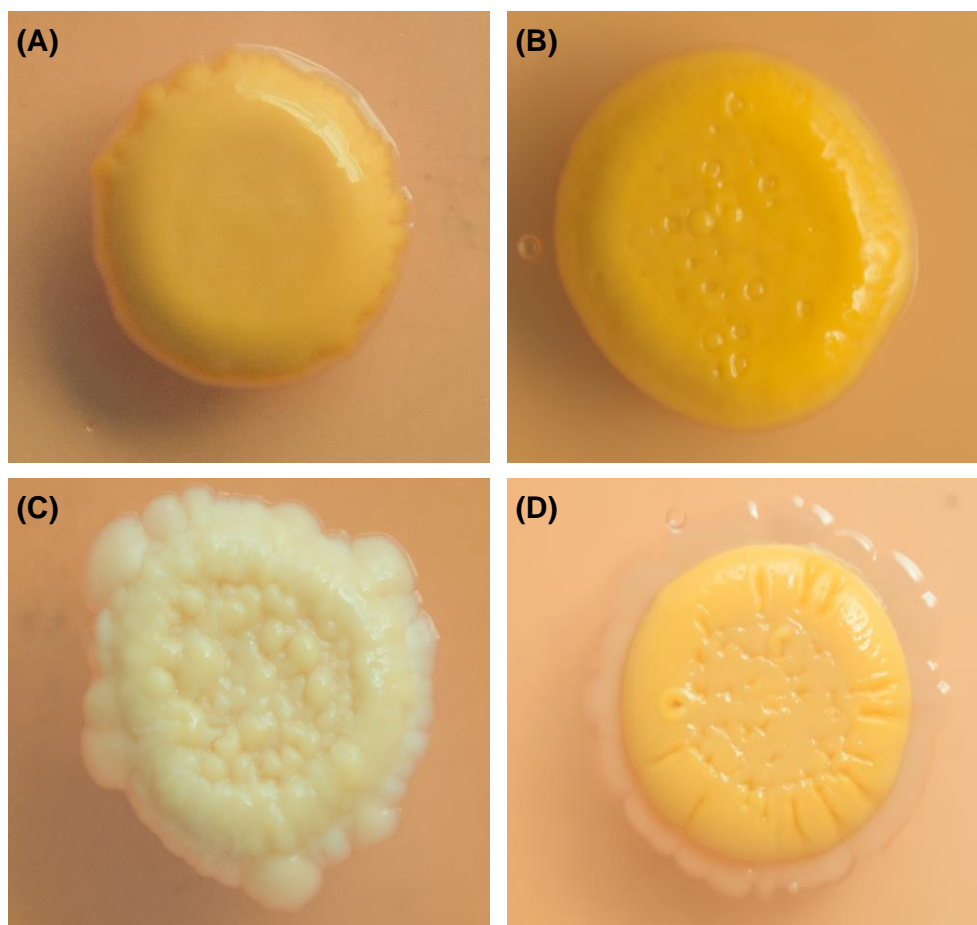
También se ha observado transición entre morfotipos liso a rugoso en cepas MAC, pero no el caso contrario [57][55][56]. Al ser el morfotipo predominante en aislados clínicos de pacientes con SIDA, las variantes SmT se consideran las más virulentas y resistentes a los antibióticos [57]; mientras que las variantes SmO muestran ser no virulentas y las Rg muestran una virulencia variable [54].

Thorel y colaboradores demostraron que entre los morfotipos SmT y SmO existen diferencias sutiles en la producción de antígenos; según los datos de esta investigación la variante SmT produce polisacáridos en la envoltura celular que no se detectaron en SmO, pero no se proporcionaron detalles en cuanto a la naturaleza y tipo de estos antígenos y la diferencia en la virulencia no ha sido definida [54][118].

También se ha observado que entre las variantes SmO y SmT de *M. avium* la composición de GPLs es idéntica, lo que descarta que la presencia de GPLs esté implicada en la preferencia del morfotipo SmT e indirectamente en la virulencia [57] [119].

Es muy probable que al ser una especie MAC, el perfil de GPLs de *M. colombiense* este asociado con la morfología de colonia de las cepas; en consecuencia, más adelante en este trabajo se analizaron los extractos lipídicos totales en las cepas de *M. colombiense* de morfología de colonia lisa y rugosa.

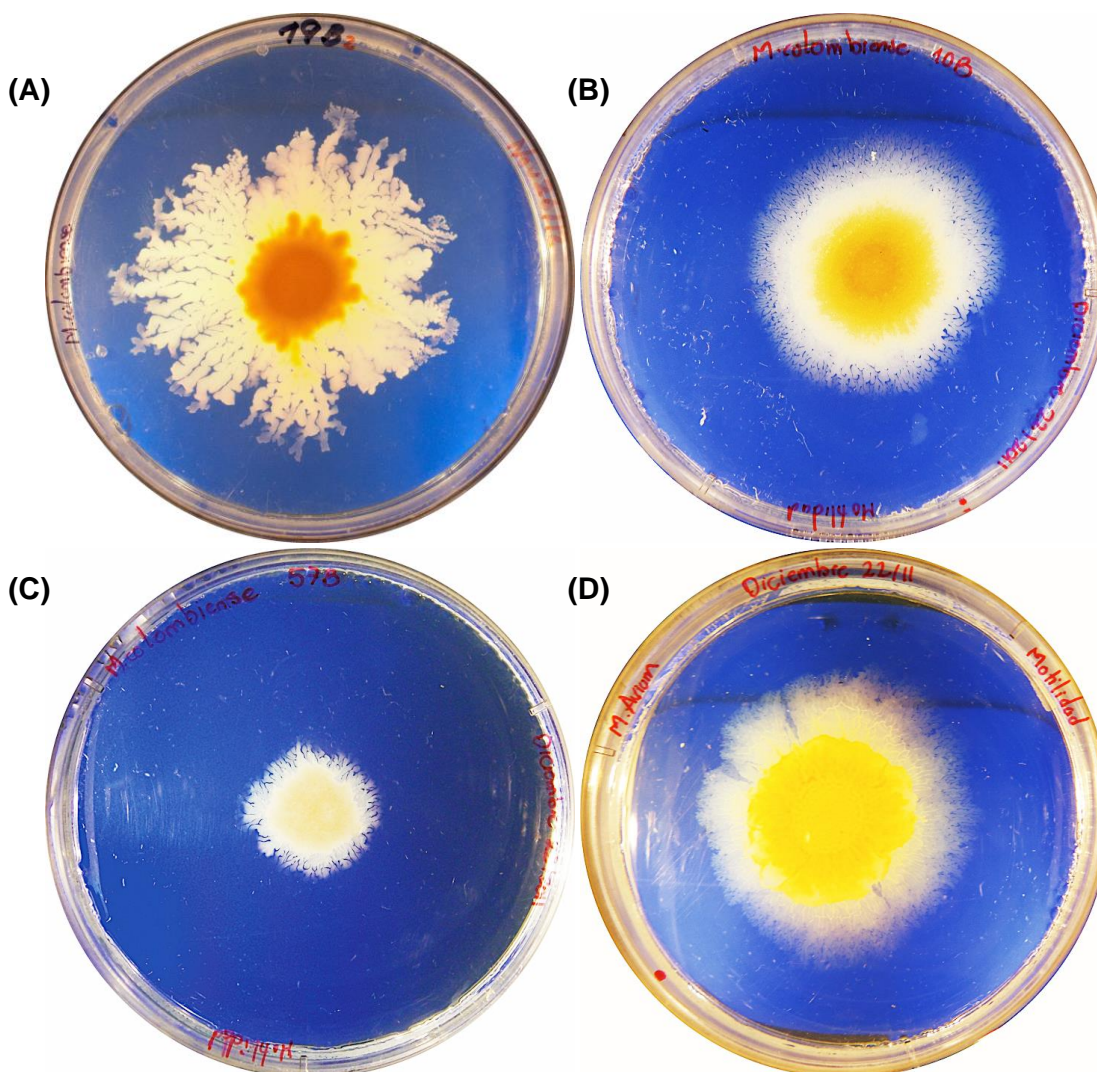
Figura 6-2: Morfología de colonia de las diferentes cepas de *M. colombiense*. (A) Cepa 19B; (B) Cepa 10B; (C) Cepa 57B y (D) *M. avium* 104 en crecidas 7H10-OADC-100 µg/mL Rojo Congo.



6.2 Ensayo de motilidad

Por medio de este ensayo se evaluó la capacidad motil y su relación con el morfotipo de colonia, de las distintas cepas de *M. colombiense*. Las cepas 10B y 19B presentaron mayor capacidad de motilidad, lo que coincidió con su morfología de colonia lisa (**Figura 6-2, Figura 6-3 y Figura 6-4**). Como se observa en la **Figura 6-4**, *M. colombiense* 19B (lisa) siempre mostró la máxima capacidad motil ($40.94 \pm 0.05 \mu\text{m/h}$); por su parte, la cepa 10B (CECT 3035) también lisa, mostró una capacidad de motilidad intermedia ($29.72 \pm 0.05 \mu\text{m/h}$), similar a la cepa control *M. avium* 104 ($30.43 \pm 0.05 \mu\text{m/h}$).

Figura 6-3: Ensayo de motilidad en medio 7H9-OADC-0.35% agarosa de *M. colombiense*.
(A) Cepa 19B; (B) Cepa 10B (CECT 3035); (C) Cepa 57B y (D) *M. avium* 104.

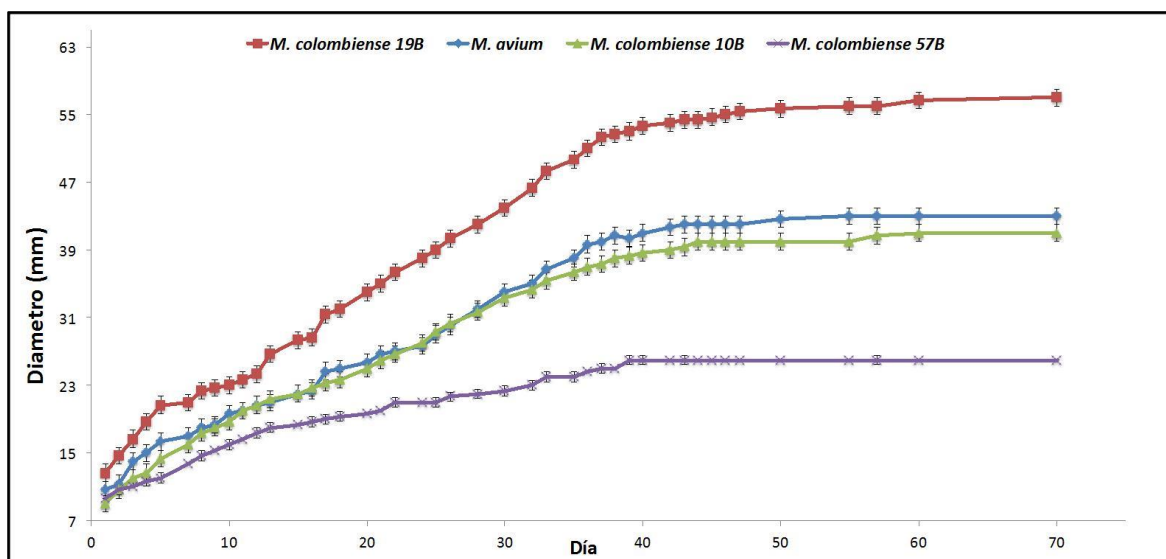


Por el contrario la variante rugosa 57B mostró una capacidad de motilidad muy reducida, ($19.01 \pm 0.05 \mu\text{m/h}$), este valor de velocidad de deslizamiento es muy bajo al ser comparado con la cepa control *M. avium* 104 ($30.43 \pm 0.05 \mu\text{m/h}$). En este caso es más adecuado afirmar que los valores de motilidad obtenidos son atribuibles al crecimiento de la cepa y no al esparcimiento propiamente dicho en la placa de motilidad (**Figura 6-3** y **Figura 6-4**). La velocidad de motilidad en el ensayo se determinó midiendo los diámetros de esparcimiento durante el tiempo de incubación hasta que éste se hizo constante, es decir, cuando las cepas dejaron de esparcirse en el medio de motilidad (**Figura 6-4**) (**Tabla 6-1**).

Tabla 6-1: Velocidades de motilidad de las diferentes cepas de *M. colombiense* en medio 7H9-OADC-0.35% agarosa.

Cepa	Velocidad de deslizamiento ($\mu\text{m/día}$)
<i>M. avium</i> 104	$30,43 \pm 0,05$
<i>M. colombiense</i> 19B	$40,94 \pm 0,05$
<i>M. colombiense</i> 10B	$29,72 \pm 0,05$
<i>M. colombiense</i> 57B	$19,01 \pm 0,05$

Figura 6-4: Cinética de motilidad de cepas de *M. colombiense*. *M. colombiense* 19B (rojo), 10B (CECT 3035) (verde), 57B (morado) y el control *M. avium* 104 (azul), en el medio 7H9-OADC-0.35% agarosa. Las barras representan la desviación estándar calculada a partir de tres experimentos independientes.



Los valores de motilidad obtenidos para las diferentes cepas de *M. colombiense* son menores en comparación al reportado para *M. smegmatis* mc²155 de $151,04 \pm 0,05$ $\mu\text{m}/\text{día}$ [81], pero similares al obtenido con la cepa control *M. avium* 104 ($30,43 \pm 0,05$ $\mu\text{m}/\text{día}$).

Es predecible que la mayor velocidad de motilidad de *M. smegmatis* sea debido en parte a su carácter de rápida crecedora; como se mencionó anteriormente, este tipo de motilidad superficial es producida por las fuerzas expansivas del crecimiento poblacional bacteriano en colaboración con algunas propiedades de la superficie celular. De esta forma, los valores de motilidad entre *M. avium* y *M. colombiense* son cercanos al ser micobacterias pertenecientes al MAC, ser lentas en su crecimiento y estrechamente relacionadas genéticamente.

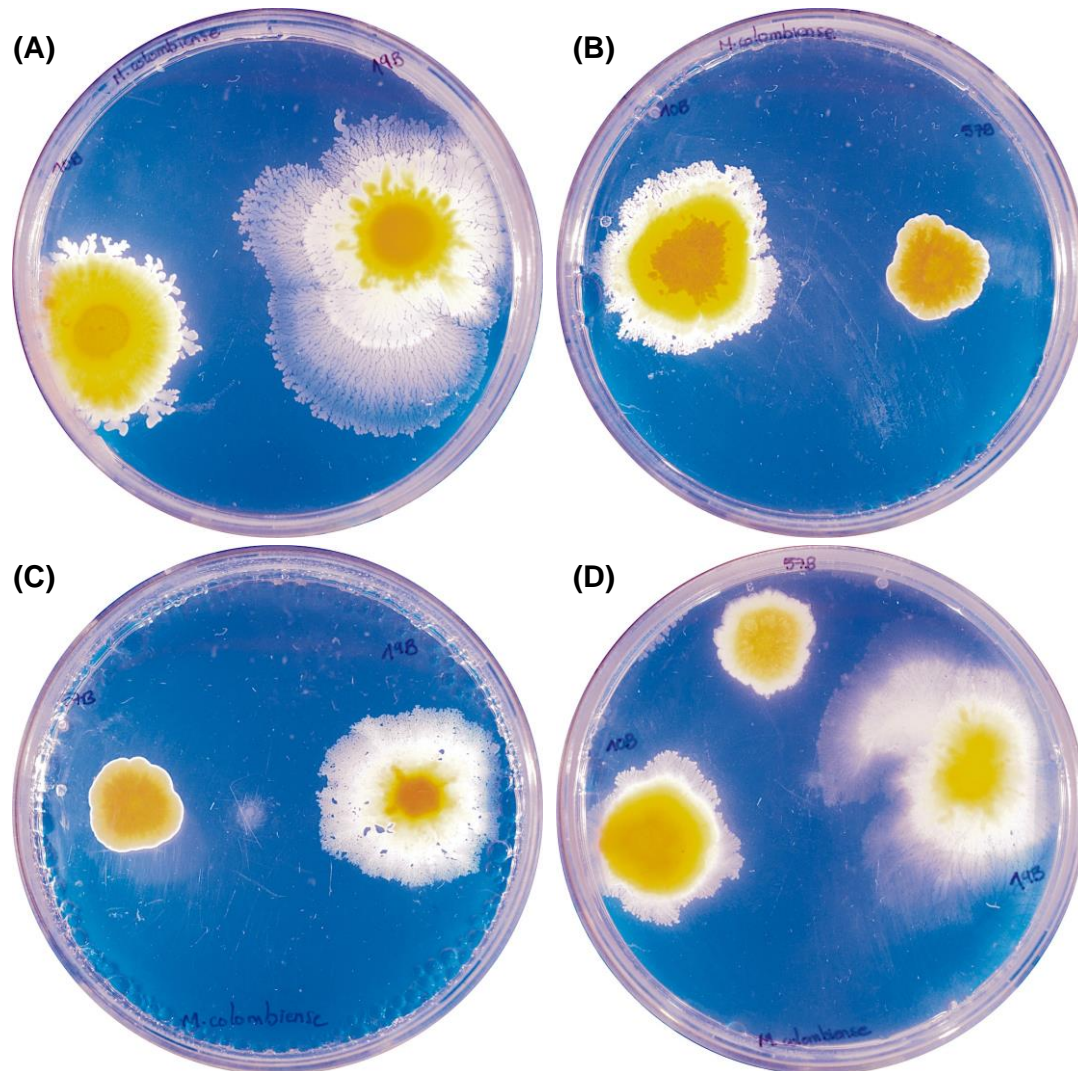
El ensayo de motilidad también se realizó inoculando las distintas cepas de *M. colombiense* en la misma placa de cultivo con la idea de hacer un comparativo de su deslizamiento, que a su vez proporciona una idea de su capacidad para el acceso a nutrientes y colonización (**Figura 6-5**). En la **Figura 6-5**, se observa que las cepas 10B y 19B de morfotipo liso se deslizan mostrando mayor capacidad de colonización sobre la superficie sólida y mayor facilidad de acceso a los nutrientes del medio, en comparación de la variante rugosa 57B.

Estudios anteriores determinaron la conveniencia de utilizar agarosa como agente solidificante en el medio de motilidad (7H9-OADC), con el fin de generar una superficie hidrofílica que facilite la motilidad por mecanismos de deslizamiento [13]. Ensayos utilizando un amplio rango de concentraciones de agarosa (0,1-0,8%) ayudaron en el pasado a establecer la importancia del porcentaje de agarosa en el medio, de lo que se puede deducir que el diámetro del halo de esparcimiento es inversamente proporcional a la concentración de agarosa, indicando que la humedad del medio es un parámetro crítico y afecta al desplazamiento superficial [13].

En los ensayos de motilidad, el diámetro del halo se correlaciona con la densidad de empaquetamiento de las células dentro de la monocapa [13]; por ejemplo, en concentraciones altas de agarosa (0,8%) las células en la monocapa se encuentran más juntas y empaquetadas en comparación con ensayos realizados a menor porcentaje de agarosa [13]. Por este motivo, en el presente trabajo se usaron medio de motilidad

solidificado con 0,35% de agarosa, para garantizar un medio adecuado para evaluar esta propiedad fenotípica [12].

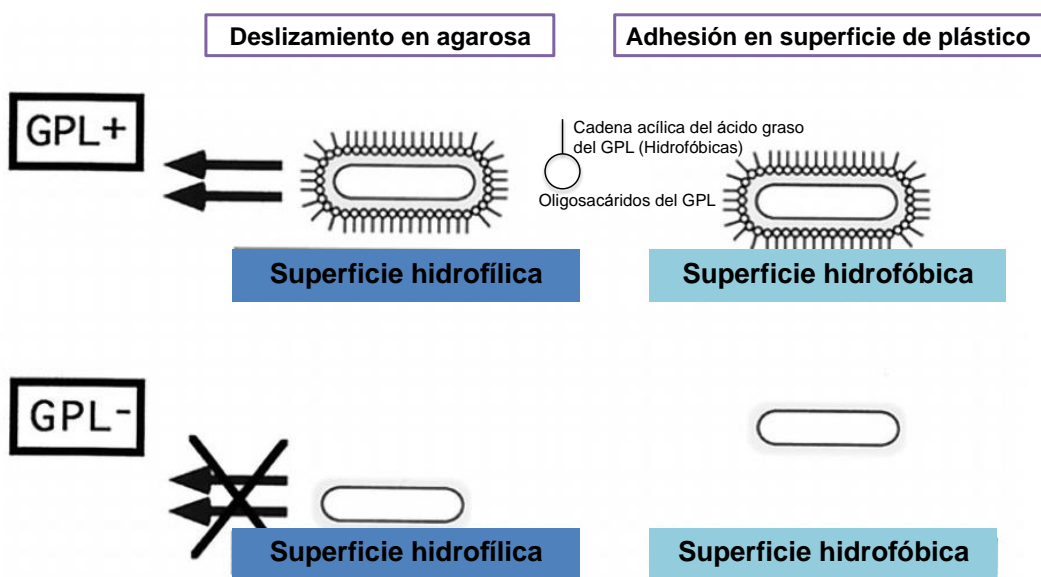
Figura 6-5: Comparación de la motilidad entre cepas de *M. colombiense*. (A) 10B y 19B; (B) 10B y 57B; (C) 19B y 57B; (D) 10B, 19B y 57B.



La motilidad desempeña un papel crucial en la capacidad de colonizar superficies del medio y en el interior del huésped, siendo determinante en la virulencia de patógenos oportunistas como *M. avium* [13]. Bajo esta premisa, *M. colombiense* podría esparcirse o translocarse sobre superficies ambientales y colonizar mucosas del tracto gastrointestinal después de la ingestión o inhalación de agua contaminada como ocurre en especies del MAC [120][121], [122].

Tal como sucede en otras especies MAC [13], la motilidad de *M. colombiense* podría estar favorecida por la presencia GPLs en la capa más externa de la envoltura celular. Recht y colaboradores (2000) propusieron que los GPLs estarían unidos a través de la cabeza hidrofílica a la cápsula celular, exponiendo las cadenas hidrocarbonadas del ácido graso del GPL hacia el exterior, logrando que la superficie bacteriana sea más hidrofóbica y por tanto reduciendo las interacciones con la agarosa facilitando la difusión celular en el medio sólido [12] (**Figura 6-6**) .

Figura 6-6: Modelo explicativo de la acción de GPLs en la motilidad por deslizamiento y formación de BP en superficies de plástico (Tomado de Recht *et al.*, 2000) [12] .



Mutantes de *M. smegmatis* Δmps ó $\Delta tmt pC$ incapaces de sintetizar o exportar GPLs, no mostraron capacidad de motilidad por deslizamiento; por lo que se supone que estas cepas poseen una envoltura hidrofílica lo que reduciría la capacidad de esparcirse sobre superficies hidrofílicas de agarosa (**Figura 6-6**) [12]. Aunque los detalles de la ubicación de los GPLs en la superficie celular aún no se han definido, los resultados del estudio de Recht y colaboradores proporcionan una evidencia del papel crítico de los GPLs en la motilidad por deslizamiento en superficies hidrofílicas como en las placas de agarosa [12].

Se ha postulado que la motilidad por deslizamiento también podría estar relacionada con la secreción de biosurfactantes desde el interior de las micobacterias [13][12]. Se ha visto que lipopéptidos cíclicos con actividad surfactante median la motilidad de especies bacterianas como *Serratia*; por su parte, ramnolípidos secretados por *Pseudomonas aeruginosa*, también con características biosurfactantes, facilitan su desplazamiento bacterial sobre superficies sólidas de agarosa o agar en baja concentración [123]. Específicamente, estos biosurfactantes son secretados en el medio sólido reduciendo la tensión superficial, formando una película hidrofóbica sobre la superficie de agarosa, lo que reduce las interacciones con la interfase hidrofílica y promueve la difusión en el medio sólido [13].

La translocación bacteriana sobre superficies sólidas requiere una reducción de la fricción entre las células y el sustrato. En particular, el movimiento de las células sobre la superficie de una placa de agar o agarosa debe ser facilitado por una reducción de las interacciones hidrofílicas entre la bacteria y la superficie. De esta forma, algunos compuestos de la superficie bacteriana como por ejemplo lipopéptidos, sulfonolípidos, y polisacáridos tendrían un profundo efecto biosurfactante (reduciendo la tensión superficial) en la interacción de las bacterias con la interfase [124].

Para evaluar el fenómeno de surfactantes, en el presente trabajo se realizó un test conocido como colapso de gota, el que es útil para detectar la posible secreción de sustancias biosurfactantes a partir de bacterias, y en nuestro caso permitiría conocer si sustancias secretadas desde el interior celular estarían en la motilidad de *M. colombiense*. Esta prueba se fundamenta en la desestabilización de las gotas de un líquido por agentes tensoactivos.

Las gotas de una suspensión celular o del sobrenadante de un cultivo bacterial se colocan sobre una superficie sólida recubierta con aceite. Si el líquido no contiene tensoactivos o biosurfactantes, las moléculas polares del agua son repelidas por la superficie hidrófoba y la gota se mantiene estable. En cambio, si el líquido contiene tensoactivos, las gotas se extienden o colapsan porque la fuerza o tensión interfacial entre la gota y la superficie hidrófoba se reducen. La estabilidad de la gota depende de la concentración del agente tensoactivo y se correlaciona con la tensión superficial e interfacial [125].

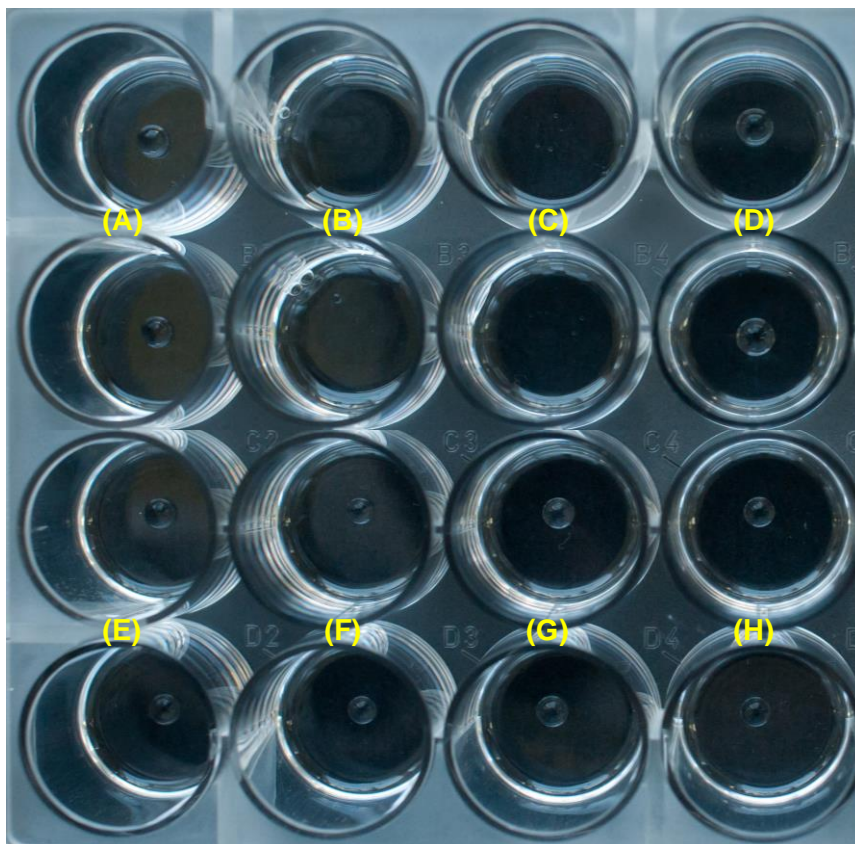
En nuestro caso se utilizaron agua estéril y *M. smegmatis* mc²155 como controles negativos, además de SDS al 10% (tensoactivo sintético iónico) y *P. aeruginosa* (secreta biosurfactantes naturales) como controles positivos. Es importante aclarar que para este ensayo se hizo una suspensión celular a partir de las cepas crecidas y esparcidas en el medio de motilidad, suponiendo que bajo estas condiciones de crecimiento la micobacteria secretaría estas moléculas favoreciendo su motilidad en el medio de cultivo.

En la **Figura 6-7**, se muestra el resultado del test colapso de gota para las cepas de *M. colombiense*. Se observa como al añadir 10% SDS, la gota del detergente colapsa, mientras que la gota se mantiene estable con el tiempo al añadir agua estéril. En cuanto a los controles biológicos, se observa que la gota de suspensión celular de *M. smegmatis* mc²155 se mantiene estable como se esperaba porque se conoce esta cepa no secreta ningún tipo de biosurfactante [12] estando su capacidad motil relacionada con la presencia de GPLs en su envoltura celular favoreciendo que la micobacteria se desplace en superficies hidrofílicas mediante un mecanismo de deslizamiento, producida por las fuerzas expansivas del crecimiento poblacional bacteriano, junto a propiedades de la superficie celular que reducen la fricción entre las células y el sustrato [13][98].

En la **Figura 6-7**, también se observa que la gota de la suspensión celular de *P. aeruginosa* colapsa en contacto con la superficie de aceite debido a que esta cepa secreta ramnolípidos, un biosurfactante aniónico que reduce la tensión interfacial entre la gota y la superficie hidrófoba [109].

Para el caso de las cepas de *M. colombiense* se encontró que las gotas de la suspensión celular se mantuvieron estables con el tiempo, resultado que da a entender que *M. colombiense* no secreta algún tipo de biosurfactante que indirectamente pueda favorecer su capacidad motil. Bajo estas condiciones el deslizamiento de las cepas de *M. colombiense* se produciría entonces por la acción de moléculas hidrofóbicas unidas a su cápsula. Al pertenecer *M. colombiense* al complejo MAC es probable que un posible contenido GPLs en su envoltura celular pudiera estar relacionado con la motilidad de esta especie.

Figura 6-7: Test colapso de gota. (A) agua estéril (gota estable); (B) 1% SDS (colapso de gota); (C) *P. aeruginosa* (colapso de gota); (D) *M. smegmatis* mc²155 (gota estable), suspensión celular de diferentes cepas de *M. colombiense* (E)19B; (F)10B (CECT 3035); (G)57B y (H) *M. avium* 104. Este ensayo fue hecho tres veces de manera independiente y cada punto fue realizado por duplicado



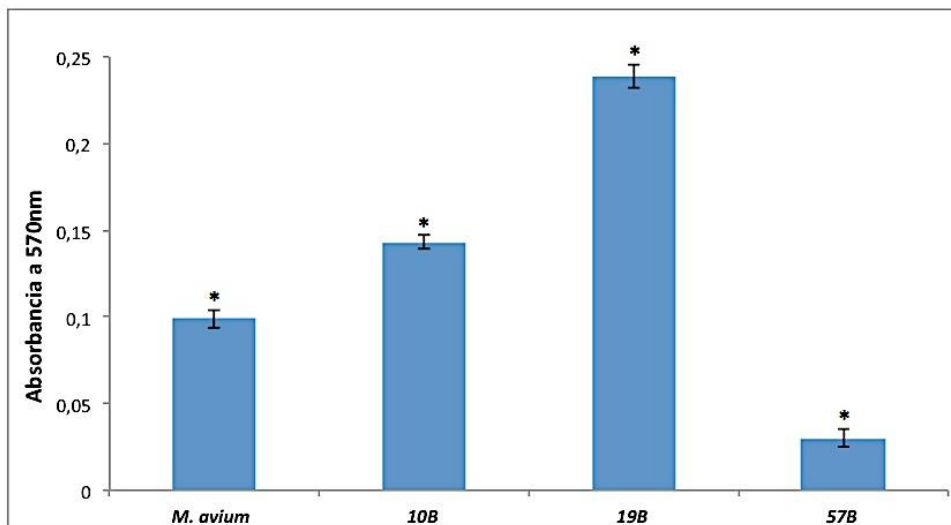
Respecto a las condiciones del test de colapso de gota, es importante tener presente que la cantidad de tensoactivo requerida para causar el colapso de las gotas acuosas en las superficies de aceite depende de su capacidad para reducir la tensión superficial e interfacial [126]. Algunos estudios han demostrado que el ensayo del colapso de gota es sensible incluso a bajas concentraciones de biosurfactante secretado [109]; este sería el ejemplo de ramnolípidos de *P. aeruginosa*, nuestro control positivo, y surfactinas de *Bacillus subtilis*, los que son secretados a una concentración de 10 mg/L aproximadamente [126]. Por lo tanto el test de colapso de gota fue considerado adecuado y rápido para determinar si un microorganismo produce o no biosurfactantes.

6.3 Cuantificación de formación de biopelículas

La capacidad de formación de BP de *M. colombiense* se cuantificó utilizando el método de tinción con cristal violeta [12]. Inicialmente se estandarizó la cantidad de inóculo de cultivo de micobacteria crecida hasta un $OD_{600} = 0.6$ ($\sim 2.7 \times 10^5$ UFC); se probaron cantidades de 25 μ L, 50 μ L, 75 μ L y 100 μ L de cultivo en un volumen final de 200 μ L completado con 7H9-ADC, mostrando que la cantidad adecuada de inóculo era de 75 μ L.

Los resultados ilustrados en la **Figura 6-8** muestran que las cepas 19B y 10B de morfología de colonia lisa son las de mayor capacidad de formación de BP sobre la superficie de poliestireno. La cepa 19B mostró la máxima capacidad de formar BP ($Abs_{570nm}=0,239$) en comparación de las demás cepas; por su parte, la cepa tipo 10B (CECT 3035) presentó una capacidad intermedia ($Abs_{570nm}=0,143$) similar a la mostrada por la cepa de referencia *M. avium* 104 ($Abs_{570nm}=0,099$), y por el contrario, la variante rugosa 57B mostró la menor capacidad de adhesión a superficies de poliestireno ($Abs_{570nm}=0,030$).

Figura 6-8: Cuantificación de BP por el método de tinción de cristal violeta. La cantidad de BP formada por *M. colombiense* 10B , 19B y 57B y *M. avium* 104 (control positivo) se estimó cuantificando a 570 nm la cantidad de cristal violeta fijada por las bacterias establecidas como BP sobre las paredes de los pozos de poliestireno. Los valores se calcularon a partir de dos experimentos independientes, realizando ocho replicas para cada punto. *Diferencia estadística significativa $P<0.05$.



Yamazaki y colaboradores (2006) evaluaron la capacidad de cepas de *M. avium* para formar BP utilizando el método del cristal violeta en microplacas de 96 pozos de PVC [97]. Al usar una concentración del 2% de cristal violeta, luego de 14 días de cultivo a partir de un inóculo de 1×10^8 bacterias en buffer HBSS, se encontraron valores de absorbancia $0,041 \pm 0,001$ para *M. avium* 104 y de $0,136 \pm 0,031$ para *M. avium* A5. [97].

Bajo las mismas condiciones pero utilizando cristal violeta al 1% y un inóculo de 1×10^7 bacterias, Carter y colaboradores (2003) determinaron la capacidad de formar BP de aislados clínicos de *M. avium* encontrando valores de absorbancia de $0,273 \pm 0,044$ para la cepa 104 y de $0,316 \pm 0,044$ para la cepa A5 [14].

Al comparar, los valores de absorbancia para las BP cuantificadas de *M. avium* difieren de los de *M. colombiense* encontrados en este trabajo, posiblemente debido a las diferencias metodológicas y condiciones del ensayo, como por ejemplo el material de las microplacas de 96 pozos, cantidad de inóculo y concentración de cristal violeta.

Carter y colaboradores (2003) también estimaron la formación de BP en presencia de diferentes iones encontrando un favorecimiento en su formación a una concentración de $1 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} , Mg^{2+} y Zn^{2+} , pero inhibiendo al suplementar con Fe^{2+} a la misma concentración. Otros estudios han mostrado que fuentes de carbono de glucosa y peptona incrementan la formación de BP; por el contrario las BP son inhibidas parcialmente por la presencia de ácido húmico [14].

En conclusión, la capacidad de *M. avium* y otras especies MAC de formar BP depende tanto de la cepa como de las condiciones del ensayo, la cantidad de nutrientes, iones y otras sustancias presentes en el medioambiente pueden tener un papel regulador en la formación de BP [14]. Los estudios de la capacidad de formación de BP de las especies MAC también resaltan la importancia de los GPLs en la interacción inicial y la adherencia de la micobacteria a las superficies sólidas.

Mutantes de *M. avium* A5 del gen *pstB* involucrado en la síntesis de los GPLs mostraron una significativa disminución en la capacidad de formar BP en placas de PVC [123][97], por lo que esta molécula tendría un papel relevante en el establecimiento de la adhesión inicial de la BP[97].

A diferencia de otras bacterias, las micobacterias no poseen extensiones proteicas que permitan establecer interacciones iniciales con la superficie, ni genes asociados a la producción de exopolisacáridos [104] para constituir una matriz que permita mantener las células juntas formando canales por donde circulan agua, enzimas, nutrientes y residuos [127].

Sin embargo, Recht y colaboradores (2000) han propuesto que interacciones hidrofóbicas entre las cadenas alifáticas del ácido graso de los GPLs y la superficie del plástico serían las responsables para el paso inicial de adherencia y posterior formación de BP, aunque este modelo explicativo todavía no se ha demostrado [12]. Otra teoría sugiere que AM de cadena corta (C_{56} - C_{68}) tienen un papel importante en la maduración de las BP [106]; sin embargo, es necesario determinar si estos AM están asociados exclusivamente con la superficie celular o pueden ser liberados para formar una matriz extracelular hidrofóbica y así favorecer la maduración de la BP [104][106].

Tanto la evidencia experimental obtenida en este trabajo como lo reportado en la literatura podría sugerir que el paso inicial de adhesión en superficies hidrofóbicas y la capacidad diferencial de formar BP entre las diferentes cepas de *M. colombiense* podría estar relacionado con la presencia de GPLs en la envoltura celular. Por lo tanto, a continuación se procedió analizar el contenido de estos glicolípidos en las cepas de estudio y su relación con la formación de BP y la motilidad.

6.4 Determinación del contenido GPLs en cepas de *M. colombiense* mediante CCF

El protocolo utilizado para la obtención de extractos permitió la recuperación de una gran proporción de glicolípidos presentes en la envoltura celular de *M. colombiense* y *M. avium*, que se utilizó como cepa control.

De acuerdo a lo observado en la **Tabla 6-2**, se obtuvieron aproximadamente entre 25-50 mg de extracto crudo/g de micobacteria en peso húmedo. En la partición de los extractos crudos con CHCl_3 :MetOH:H₂O (8:4:2, v/v/v) se permitió la separación en la fase acuosa de proteínas y azúcares, que corresponden a moléculas polares presentes en la cápsula micobacterial que también son extraídas con la mezcla de solventes CHCl_3 :MetOH.

Tabla 6-2: Cuantificación de extractos lipídicos de *M. colombiense* y *M. avium*. Obtenidos mediante extracción con solventes orgánicos a partir de micobacterias crecidas en condiciones planctónicas y de motilidad. *La cantidad de extracto obtenido se refiere a partir de 1 g de micobacteria en peso húmedo.

Cepa	Extracto lipídico (mg) a partir de condición planctónica	Extracto lipídico (mg) a partir de condición motil
<i>M. avium</i> 104	41,60	52,70
<i>M. colombiense</i> 19B	34,60	51,29
<i>M. colombiense</i> 10B	35,50	59,72
<i>M. colombiense</i> 57B	20,40	24,58

En general se observó mayor contenido de extracto lipídico (mg) a partir de micobacterias crecidas en medio de motilidad (**Tabla 6-2**). Los extractos lipídicos de las cepas 10B y 19B de *M. colombiense* muestran rendimientos similares y mayores en comparación de la cepa 57B, cepa de la que se obtuvo menor cantidad de extracto lipídico tanto a partir de células crecidas en condiciones planctónicas, como de motilidad.

Los extractos lipídicos del control *M. avium* 104 mostraron rendimientos similares a las cepas 19B y 10B de morfotipo liso en condiciones de motilidad, pero en condiciones planctónicas se obtuvo mayor cantidad de extracto lipídico de *M. avium* en comparación de las cepas de *M. colombiense* (**Tabla 6-2**)

Debido a que las células se crecieron hasta fase estacionaria de crecimiento en condiciones planctónicas y de motilidad, los extractos lipídicos totales obtenidos a partir de mostraron marcadas diferencias en su apariencia y coloración dependiendo del morfotipo liso o rugoso de las células de *M. colombiense*. Específicamente, los extractos lipídicos de las cepas 19B y 10B mostraron una coloración amarillo-traslúcido de apariencia similar al de la cepa control *M. avium* 104; mientras que el extracto de la

variante rugosa mostró ser transparente a partir de células crecidas en condiciones planctónicas y de color crema-blanco a partir de bacterias crecidas en el medio de motilidad (**Anexo A, Figura A-3**).

Para la detección de GPLs, los extractos lipídicos se analizaron mediante CCF en placas de Sílica Gel-60 desarrolladas utilizando una fase móvil de CHCl_3 :MetOH:H₂O (65:25:4, 30:8:1 ó 65:30:8 v/v/v). El sistema cromatográfico (65:25:4 v/v/v) anteriormente ha mostrado ser apropiado para el análisis de GPLs serotipo específicos de *M. avium* y otras cepas de MAC; además este sistema se considera aplicable a una mayor variedad de serotipos (ssGPLs) en comparación de otros sistemas de solventes empleados en CCF [128] [58].

En la **Figura 6-9** se puede observar que las cepas *M. colombiense* 19B y 10B (CECT 3035) crecidas bajo condiciones planctónicas contienen glicolípidos con comportamiento cromatográfico similar a los GPLs polares de *M. avium* [14]. Específicamente, la cepa 19B exhibió 4 señales con factores de retención (R_f) de 0.69, 0.74, 0.76 y 0.78 respectivamente, dos de ellas muy similares a los R_f (0.69 y 0.78) exhibido por los GPLs de *M. avium* 104 [14].

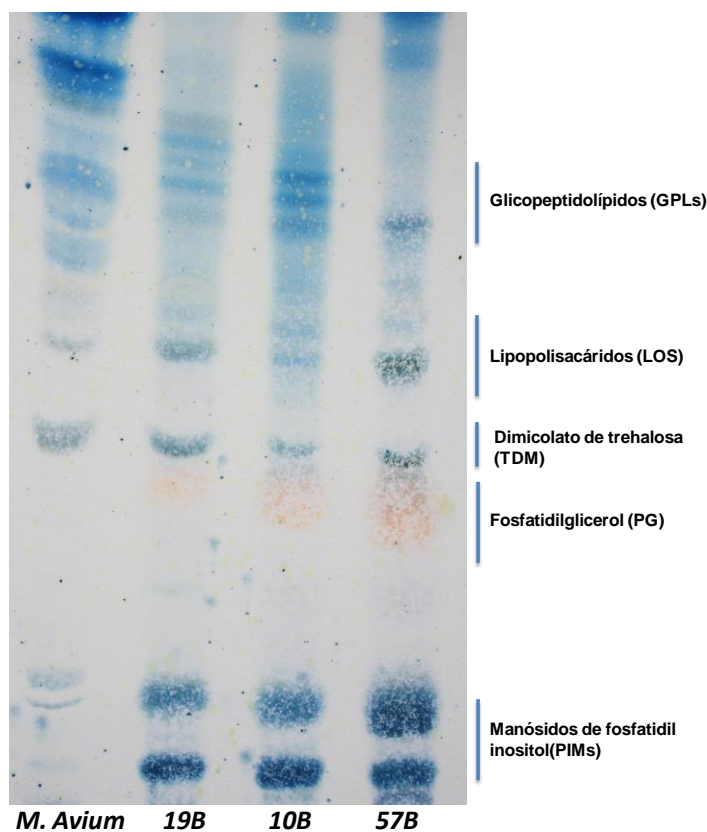
Por otra parte, la cepa 10B exhibió 3 señales con R_f de 0.74, 0.76 y 0.78 respectivamente, también similar al GPLs de *M. avium* con R_f de 0.78 [14]. Por el contrario, la variante natural rugosa 57B de morfología de colonia rugosa, mostró solo una señal con un R_f de 0,70 de una notoria intensidad menor en comparación a las señales mostradas por las cepas con morfología de colonia lisa (19B y 10B). La señal exhibida por 57B se comporta de forma similar a un GPL de *M. avium* 104 con un R_f de 0,69 reportado previamente por Carter y colaboradores en 2003 [14].

Los experimentos de CCF también mostraron que entre todas las cepas de *M. colombiense* crecidas bajo condiciones planctónicas exhiben un perfil cromatográfico similar de PIMs, TDM, LOS y PG (**Figura 6-9**).

Por lo tanto, los experimentos de CCF nos han permitido concluir que bajo crecimiento planctónico, cepas de morfología de colonia lisa (19B y 10B) producen mayor cantidad de GPLs, en comparación de la cepa de morfología rugosa que solo ha exhibido una única banda de GPL y en menor proporción, lo que a su vez sugiere que la alta producción y

contenido de estos GPLs podría estar relacionada con la morfología de colonia lisa de las cepas de *M. colombiense*.

Figura 6-9: Cromatografía en capa fina de extractos lipídicos de *M. colombiense* y *M. avium* (control) crecidas bajo condiciones planctónicas.

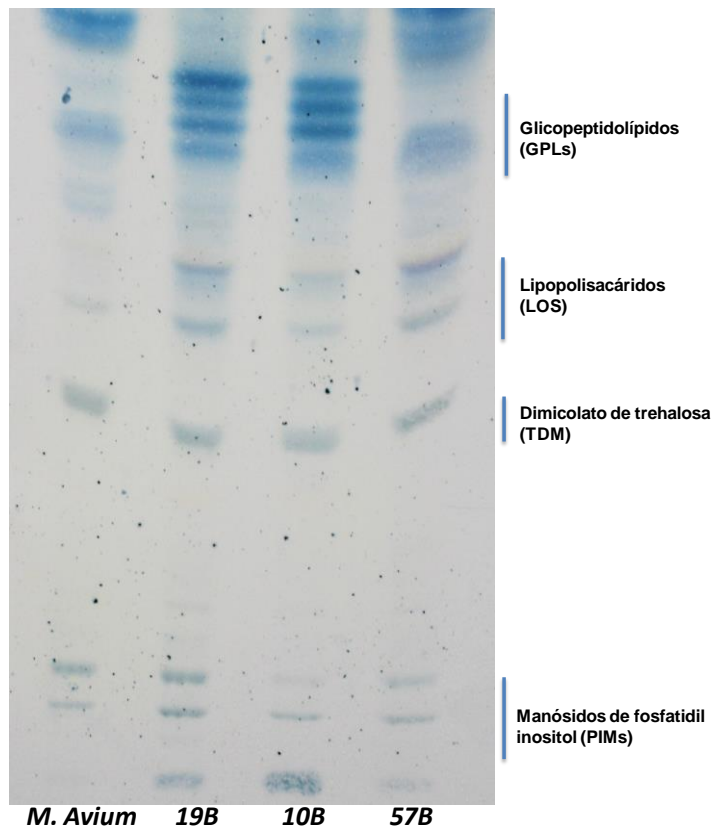


Por otra parte, en la **Figura 6-10**, se muestra el perfil cromatográfico mediante CCF de las cepas crecidas en el medio de motilidad. En general se observa que en esta condición de crecimiento existe una mayor producción de GPLs en las cepas de *M. colombiense*. Por ejemplo, las cepas 10B y 19B muestran 4 señales con factores de retención (R_f) de 0.69, 0.74, 0.76 y 0.78 que presentan un comportamiento cromatográfico similar a los GPLs polares de *M. avium* 104. Como se mencionó anteriormente, las mismas cepas pero crecidas en condiciones planctónicas exhibieron solo 3 y 4 señales, respectivamente, en una menor proporción.

Por otra parte, la cepa 57B, mostró una señal (R_f de 0,70) con desplazamiento cromatográfico similar al GPL de *M. avium* 104 con R_f de 0.69 pero en mayor proporción bajo esta condición de crecimiento. Respecto a los demás lípidos extraíbles, en la **Figura**

6-10 se observa entre las cepas de *M. colombiense* existe una producción similar de PIMs, TDM y LOS. De manera interesante, la señal de PG no se observa en ninguna cepa de *M. colombiense* crecida bajo condiciones de motilidad, contrario a lo observado en los extractos lipídicos a partir de células crecidas en condiciones planctónicas.

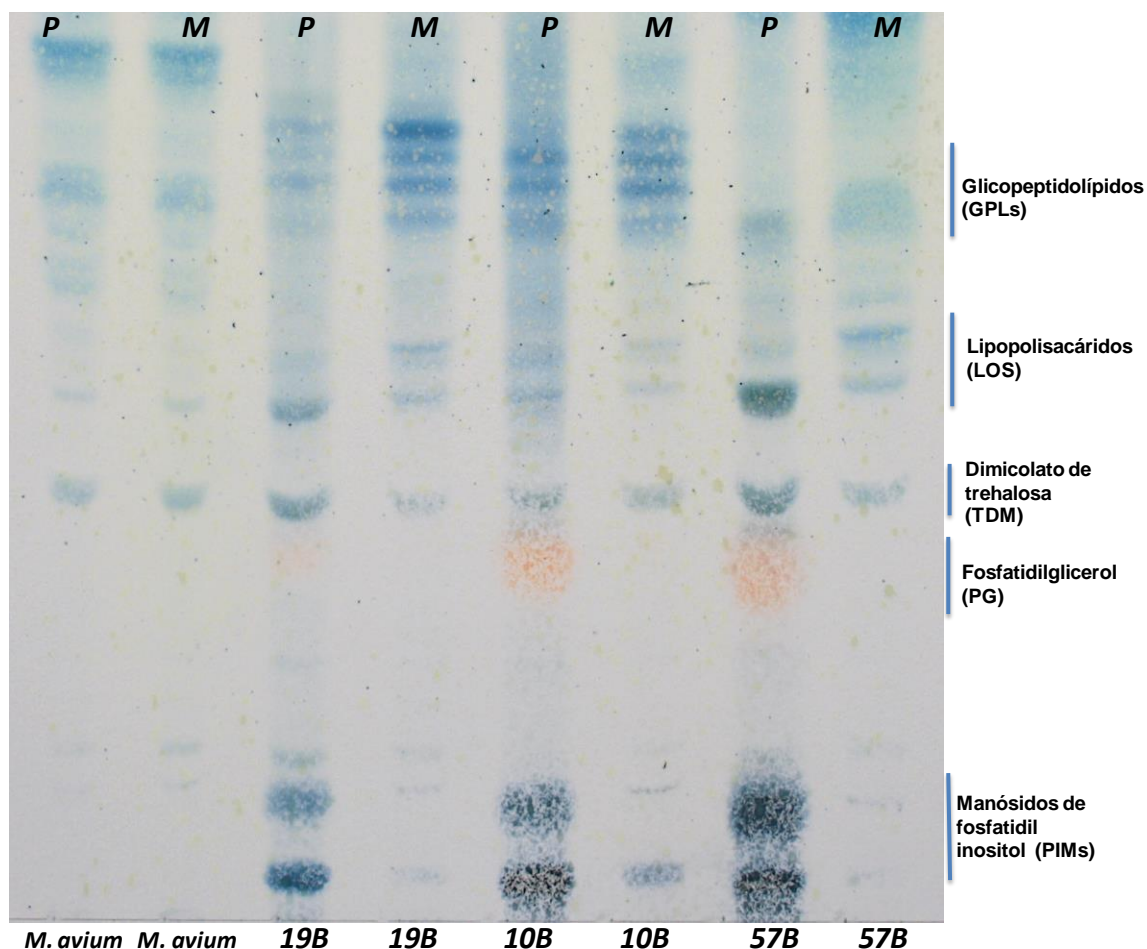
Figura 6-10: Cromatografía en capa fina de extractos lipídicos de cepas de *M. colombiense* y *M. avium* (control) **bajo condiciones de motilidad.**



Para una mayor comprensión de los resultados previos, en el mismo cromatograma se corrieron los extractos lipídicos de células crecidas en ambas condiciones de crecimiento usando *M. avium* 104 como control (**Figura 6-11**). En este experimento se puede ver más claramente que las cepas de *M. colombiense* producen mayor contenido de PIMs, TDM, LOS y PG bajo crecimiento planctónico y particularmente los niveles detectados de GPLs tienen mayor proporción en las 3 cepas de *M. colombiense* bajo crecimiento motil.

La anterior observación sugiere posibles mecanismos compensatorios en la síntesis de lípidos de la envoltura; es posible que la menor producción de PIMs, TDM, LOS y PG en las cepas de *M. colombiense* en condiciones de motilidad sea consecuencia del aumento en el contenido de GPLs, una respuesta biológica que ya se ha observado en *M. smegmatis* ATCC607 (**Anexo A, Figura A-4**) [129].

Figura 6-11: Cromatografía en capa fina de extractos lipídicos de cepas de *M. colombiense* y *M. avium* (control) **bajo crecimiento planctónico (P) y motil (M).**



En la **Tabla 6-3**, se resumen los resultados de morfología de colonia, capacidad de deslizamiento, formación de BP y detección de GPLs por CCF de las cepas de *M. colombiense*.

Tabla 6-3: Resultados de morfología de colonia, capacidad de motilidad por deslazamiento, formación de biopelículas y detección de glicopeptidolípidos de las cepas de *M. colombiense*.

Cepa de <i>M. colombiense</i>	Morfología de colonia	Capacidad de deslización	Formación de BP método cristal violeta: Abs a 570nm	Perfil cromatográfico de GPLs a partir de crecimiento planctónico	Perfil cromatográfico de GPLs a partir de crecimiento motil
10B	Lisa	Intermedia	0,143	3 bandas	4 bandas
19B	Lisa	Alta	0,239	4 bandas	4 bandas
57B	Rugosa	No presentó	0,030	1 banda muy leve	1 banda

En las MNT se ha encontrado una estrecha relación entre la morfología de colonia lisa y la capacidad motil con la presencia de GPLs capsulares [20]. Este comportamiento también se presentó en las cepas lisas 10B y 19B de *M. colombiense* que a su vez mostraron mayor capacidad de motilidad (**Figura 6-4**) y producción de GPLs (**Figura 6-11**), en comparación de la variante rugosa 57B que a su vez exhibió una menor producción de GPLs (**Figura 6-11**) y limitada capacidad de deslizarse en superficies de agarosa (**Figura 6-4**).

Es interesante observar que la producción de los GPLs se incrementó en las cepas en condiciones de motilidad, indicando que estas moléculas de alguna forma favorecen esta propiedad fenotípica. El Test Colapso de gota (**Figura 6-7**), permitió determinar que *M. colombiense* no secreta algún tipo de biosurfactantes que medien y faciliten el desplazamiento superficial de las bacterias, por lo tanto, su motilidad por deslizamiento debería ser producido por moléculas unidas a su cápsula, como los GPLs.

Se ha demostrado que la síntesis y procesamiento de GPLs en la cápsula de *M. smegmatis* y *M. avium* son esenciales para establecer interacciones iniciales en superficies de PVC durante la formación de BP. En el caso de *M. colombiense* las cepas más productoras de GPLs mostraron una mayor capacidad de formar BP en superficies hidrofóbicas de poliestireno.

En resumen se puede observar que la cepa 19B (lisa) tiene la mayor capacidad motil y de formación de BP, y a su vez que produce mayores cantidades de GPLs (**Figura 6-4**, **Figura 6-8** y **Figura 6-11**); un comportamiento mostrado de manera intermedia por la cepa 10B (lisa), mientras que la cepa 57B de morfología rugosa presentó una mínima capacidad en estas propiedades, sin embargo de manera interesante también se observó

un aumento de la capacidad de la cepa 57B de producción de GPLs en condiciones de motilidad. En conclusión los resultados obtenidos en el componente microbiológico y bioquímico del presente trabajo sugieren una estrecha y directa relación entre la producción de GPLs, motilidad y formación de BP en cepas de *M. colombiense*.

6.5 Búsqueda de genes relacionados con la biosíntesis de GPLs en *M. colombiense*

Para encontrar genes de *M. colombiense* CECT 3035 implicados en la biosíntesis de GPLs se utilizó el programa genómico BLAST y la información del locus de GPLs en *M. avium* 104 disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP000479.1> (NCBI) y la reportada por Pang y colaboradores (2013), en la **Figura 6-12**, se muestra el clúster génico de la ruta biosintética de GPLs de *M. avium* [17]. En el presente estudio, resultó conveniente utilizar el clúster génico de *M. avium* para los alineamientos, debido a su cercanía filogenética con *M. colombiense*.

Como se mencionó anteriormente, la secuencia del genoma de *M. colombiense* CECT 3035 se encuentra dividido en 18 segmentos (contigs), aún no ensamblados, en el que la mayoría de los genes involucrados en la biosíntesis de GPLs se encontraron en el contig 00001, los relacionados con la síntesis de los ácidos grasos en el contig 00003A, genes que codifican a factores sigma en el contig 00002A y en el contig 00007 el gen *gap*, que codifica una proteína requerida para el transporte de GPLs.

En la **Figura 6-13** se muestra el clúster de *M. colombiense* obtenido en el presente trabajo utilizando las ubicaciones provistas en el BLASTn en los respectivos contigs, de acuerdo al número, posición y orden del segmento como se reporta en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/wgs/?val=AFVW02>.

La lista de los genes buscados y encontrados, al igual que la función a que codifican, se relacionan en anexo B en la **Tabla B-1**. Los resultados del BLASTn para cada gen, especifica el porcentaje de identidad, valor E (significancia estadística), puntuación del alineamiento, región del genoma donde se encuentra la secuencia homóloga especificando el segmento (contig) y su posición, secuencia nucleotídica y producto

génico de la secuencia homóloga en *M. colombiense*, se muestran en la misma **Tabla B-1**.

En total se buscaron 30 genes (Anexo B, **Tabla B-1**) de los que no se encontraron *mtfA*, *gtfB*, *gtfD*, *dghA*, *fadD23*, *pe* y *gap*-like, debido posiblemente a cambios en su secuencia o que realmente no existen en *M. colombiense*. Como se mencionó anteriormente, el genoma de *M. colombiense* es notoriamente más grande (5,6Mb; 5,230 genes) que el de *M. avium* (4,8Mb; 4,400 genes), por lo que se especula que las principales diferencias podrían atribuirse a grandes inserciones genómicas, lo cual podría estar involucrado en la presencia de nuevas rutas metabólicas [61].

Una posibilidad, es que la ausencia de algunos genes en el genoma de *M. colombiense* podría ser atribuida a que existan regiones no secuenciadas entre los respectivos contigs, por lo que se debe esperar al ensamble total del genoma de dicha especie. Los restantes 23 genes fueron ubicados en *M. colombiense* con porcentajes de identidad mayor al 80% respecto a *M. avium*, por lo que fue posible adjudicar su función de acuerdo a la información depositada en Genbank (**Anexo B, Tabla B-1**).

Homólogos de los genes *mmps4* (*tmtpA*), *mmpL4a* (*tmtpB*) y *mmpL4b* (*tmtpC*) de *M. avium* responsables del ensamble y exportación del GPL en la membrana citoplasmática (**Figura 6-12**), fueron ubicados en *M. colombiense* en el contig 00001, en las posiciones 20977-21456; 21453-24344; 24491-27352, respectivamente (**Tabla B-1** y **Figura 6-13**). Estos tres genes se encuentran en posiciones cercanas entre si como sucede en *M. avium* 104 [130].

En la **Tabla B-1**, se muestran los productos génicos predichos de *mmps4*, *mmpL4a* y *mmpL4b* para *M. colombiense*, indicando que son proteínas de la familia MmpL y MmpS, como lo reportado para *M. avium* [17][86]. El gen *gap* indispensable para el transporte de los GPLs hacia la superficie celular en *M. avium* [79] se encontró en el contig 00007 en la posición 86965- 87759 de *M. colombiense* CECT 3035 anotada como una proteína hipotética (**Tabla B-1** y **Figura 6-13**) [17].

Homólogos de los ORFs *pstB*, *pstA* y *mbtH* de *M. avium* que codifican para la enzima péptido sintetasa indispensable en la síntesis del núcleo peptídico de los GPLs (**Figura 6-12**) [17], fueron encontrados en el contig 00001 en las posiciones 2007-9656; 9653-19858; 19953-20183, respectivamente del genoma de *M. colombiense*. Estos genes se encuentran muy cercanos entre sí (**Figura 6-13**) como lo observado en *M. avium* (**Figura 6-12**)[16]. Al igual que en *M. avium* los productos génicos de estos genes en *M. colombiense* son péptido sintetasa no ribosomales (PstA/PstB) y una proteína tipo-MtbH (**Anexo B ,Tabla B-1**) [17][86].

Homólogos de los genes *mftB/mftC/mftD* de *M. avium* codificantes de O-metiltransferasas (**Figura 6-12**) fueron ubicados en *M. colombiense* en el contig 00001 en las posiciones 54258-55064; 50267-51070 y 49351-50106, respectivamente (**Figura 6-13**). En *M. colombiense* las proteínas codificadas por *mftB* y *mftC* se anotan como O-metiltransferasa de macrocina, mientras en el gen *mftD* tiene como producto la proteína MtfD (**Anexo B ,Tabla B-1**).

Por la agrupación encontrada de las metiltransferasas (*mftB/mftC/mftD*) cercana a otros genes relacionados con la biosíntesis de GPLs en *M. colombiense*, nosotros proponemos que la anotación de estos genes debe ser relacionada con esta ruta sintética. Es importante resaltar que el gen *mftA* que codifica una 3-O-metil-transferasa presente en *M. avium* no se encontró en el genoma de *M. colombiense* CECT 3035 lo que nos sugiere diferencias a nivel génico entre las especies como lo sugerido anteriormente por Gonzales y colaboradores [61].

Por otro lado, homólogos de los genes *gtfA* y *rtfA* de *M. avium*, que codifican glicosiltransferasas también se encontraron dentro de este contig (00001) en las posiciones 52857-54125 y 51165-52355 respectivamente, muy cercanos entre sí, como en *M. avium* 104 (**Figura 6-12** y **Figura 6-13**). Los productos proteicos predichos en *M. colombiense* están anotados como proteínas de la familia de glicosiltransferasa (**Anexo B ,Tabla B-1**), como se ha reportado en *M. avium* [17][16].

Homólogos de los genes *rmlA* y *rmlB* de *M. avium* involucrados en la síntesis de los sustratos 6-deoxitalosa y α -L-ramnosa, necesarios para la producción de nsGPLs, se

encontraron en *M. colombiense* en diferentes contigs; específicamente, *rmlA* en la posición 355904-356779 del contig 00002A y *rmlB* en la posición 55306-56409 del contig 00001 (**Figura 6-13**). Estos resultados concuerdan con la organización del cluster genico de *M. avium*, donde los genes *rmlA* y *rmlB* se encuentran en posiciones lejanas aproximadamente 1,6Mb (**Figura 6-12**). La anotación predicha de las proteínas codificantes por *rmlA* (glucosa-1-fosfato-timidiltransferasa) y *rmlB* (proteína de la familia deshidrogenasa), concuerda con los reportes para *M. avium* (**Anexo B ,Tabla B-1**)[17].

También se encontró un homólogo del gen *atf* de *M. avium* en la posición 59477-60640 del contig 00001 de *M. colombiense*, localizado en una posición cercana a los genes codificantes de glicosiltransferasa y metiltransferasas (**Figura 6-13**), al igual que la organización en el clúster de *M. avium* (**Figura 6-12**). En *M. colombiense* se predice que este gen codifica una O-acetiltransferasa, que participa en rutas metabólicas de lípidos (**Anexo B ,Tabla B-1**), como lo reportado en *M. avium* [17].

Los genes *pks*, *papA3* y *mmpL10* se encuentran en *M. colombiense* en el contig 00003A en las posiciones 332140-343203, 330370-331776, 326135-329125 respectivamente, en posiciones cercanas entre sí (**Figura 6-13**), como sucede en micobacterias como *M. avium* (**Figura 6-12**), *M. chelonae*, *M. abscessus* y *M. smegmatis* (**Figura 2-5**) [76] [16].

Las anotaciones hechas en *M. colombiense* concuerdan con lo reportado en *M. avium* [76] [16], específicamente una poliketido sintetasa PKs, aciltransferasa PapA3 (proteína con dominio de condensación) y la proteína transmembranal MmpL10 de *M. colombiense* (**Anexo B ,Tabla B-1**). En este contig (00003A) también se encontró el gen *Rv0926* en la posición 927060-928142, y al igual que en *M. avium*, *M. smegmatis*, *M. abscessus*, *M. chelonae* su función es desconocida [17].

En el contig 00002A de *M. colombiense* se encontraron los genes *sap* y *ecf*, en las posiciones 35928-36626 y 36630-37847, respectivamente. Dichos genes fueron ubicados cercanos entre sí, como se observa también en el clúster de *M. avium* (**Figura 6-12** y **Figura 6-13**). Se predice que *ecf* codifica un factor sigma asociado a RNA polimerasa y *sap* una proteína con dominio DGPF tanto en *M. colombiense* como en *M. avium* [17] (**Tabla B-1**).

Por otro lado homólogos de los genes *fadE5* y *Rv1174* de *M. avium* se localizan en *M. colombiense* en el contig 00001 en las posiciones 93583-95409 y 146477-146815, su localización es similar como en el clúster de *M. avium* (**Figura 6-12** y **Figura 6-13**).

En *M. colombiense* se encontró que el producto génico del ORF de *fadE5* de *M. avium* es una Acil-CoA-deshidrogenasa designada como FadE15 y del gen *Rv1174* una proteína de función desconocida (**Anexo B**, **Tabla B-1**), como se ha reportado en *M. avium*, *M. abscessus* y *M. smegmatis* [17]

Con respecto a la ruta biosintética de GPLs, la cercanía y conservación de las secuencias predichas para *M. colombiense* CECT 3035, permiten inferir un probable clúster génico semejante al encontrado para *M. avium* 104. No obstante, se observan diferencias en la dirección de la transcripción de algunos ORFs entre los locus correspondientes de ambas micobacterias (**Figura 6-12** y **Figura 6-13**). Es importante conocer la distribución y orden exacto de los contigs del genoma de *M. colombiense* con el propósito de determinar de forma precisa, la ubicación del clúster génico y establecer la posible existencia de zonas no secuenciadas entre los contigs.

Adicionalmente, se postula que las diferencias en la organización génica entre estas especies podrían ser atribuidas a mecanismos adicionales de patogenicidad u organización de la estructura celular de *M. colombiense* que se refleja en la notoria extensión de su genoma comparado con el de *M. avium* [61].

6.6 Transcripción de genes relacionados con la biosíntesis de GPLs.

6.6.1 Aislamiento de DNA genómico de *M. colombiense* y *M. avium*

El producto de extracción de DNA genómico de *M. avium* y *M. colombiense* por el método de CTAB/proteínasa K, se muestra en la **Figura 6-14**; allí se puede analizar la integridad que el DNA no presenta colas de difusión, indicando que los procesos de lisis celular y extracción de proteínas de la célula han sido de buena calidad.

Figura 6-12: Organización genética del locus de GPL en *M. avium*. Se muestran genes que codifican proteínas requeridas para la translocación de GPLs a la envoltura celular, proteínas involucradas en la biosíntesis de azúcares, lípidos y péptidos, y de función desconocida (Tomado de Pang et al., 2013)[17].

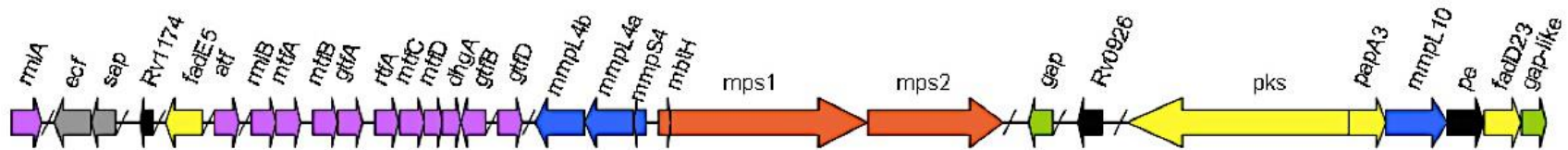
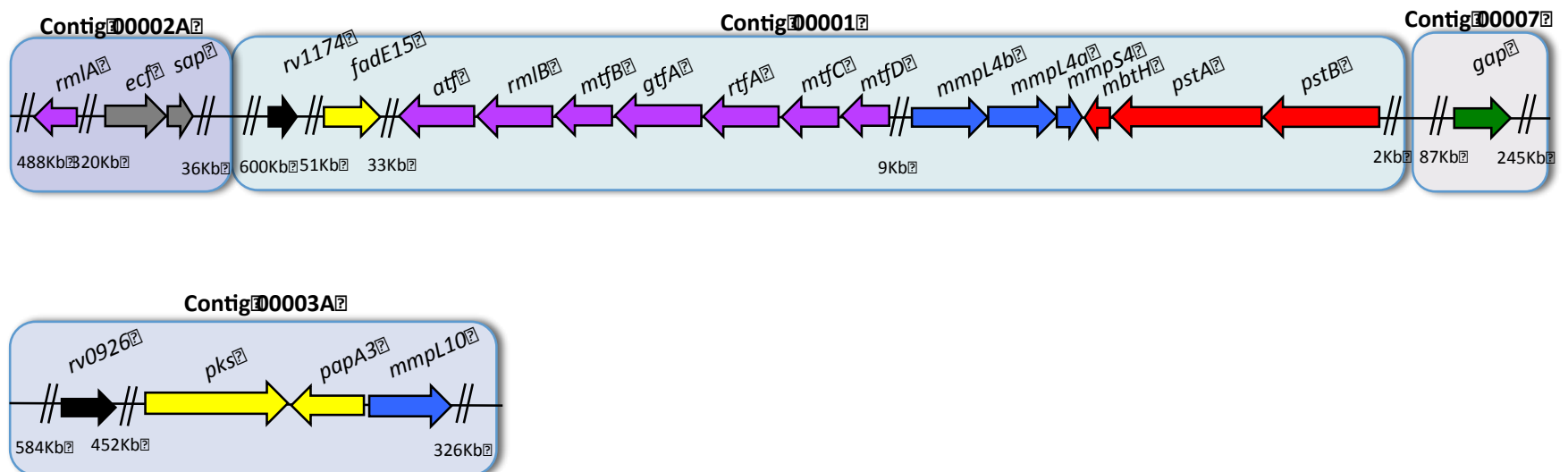


Figura 6-13: Organización propuesta para el locus de biosíntesis de GPL en *M. colombiense*. La ubicación e identidad de los genes de *M. colombiense* se estableció con la ayuda del programa BLASTn utilizando secuencias de genes homólogos anotados en el genoma de *M. avium* 104.



La relación de absorbancias 260nm/280nm obtenida fue entre 1.8–2.0, lo que significa que se aisló DNA de buena calidad y es mínima la contaminación con proteínas que puedan interferir en los procedimientos posteriores (**Tabla 6-4**).

Figura 6-14: Análisis mediante electroforesis de agarosa al 1,5% de los productos de extracción de DNA de micobacterias. 1: marcador de peso molecular 1Kb (Invitrogen); 2: *M. colombiense* 10B; 3: *M. colombiense* 19B; 4: *M. colombiense* 57B; 5: *M. avium* 104.

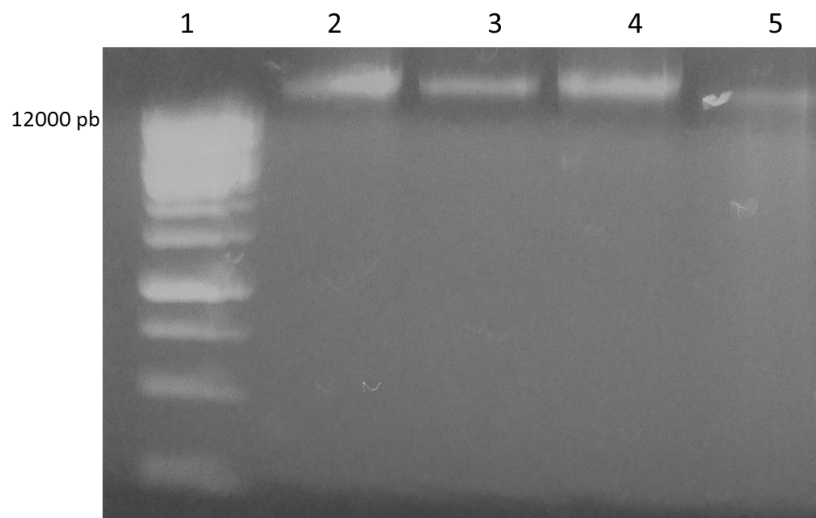


Tabla 6-4: Cuantificación y relación de pureza de DNA de *M. colombiense* y *M. avium*.

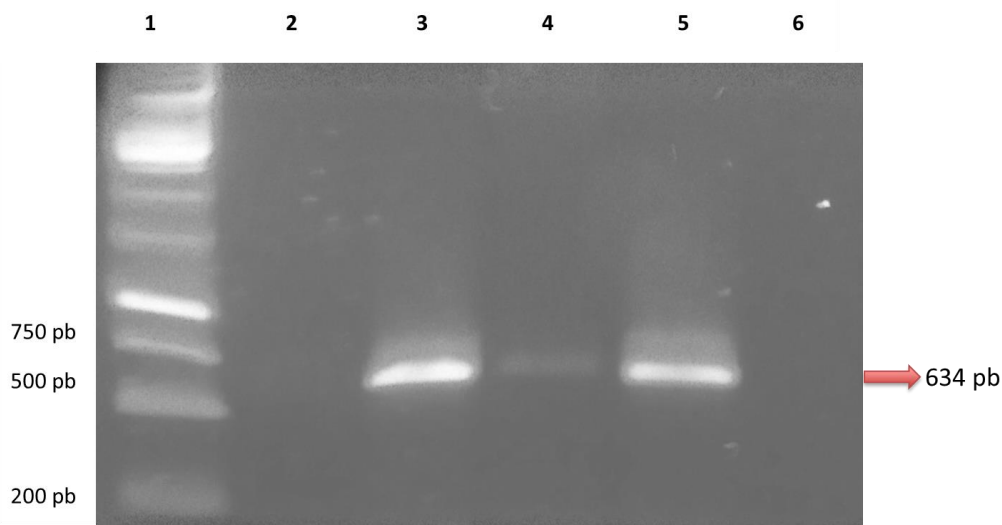
Cepa	Concentración (ng/μL)	Absorbancia 260/280
<i>M. colombiense</i> 10B	401,1	1,81
<i>M. colombiense</i> 19B	353,6	1,80
<i>M. colombiense</i> 57B	70,9	1,85
<i>M. avium</i> 104	221,1	1,89

Luego de comprobar su integridad, con el ánimo de verificar que el DNA extraído corresponde a una cepa de *M. colombiense* y no de otra micobacteria, se realizó una PCR corroborativa utilizando los iniciadores J3: 5' TGGCAGCAAAAGCGAAC 3' (directo) y 5' AAAGCGTCGCTTGGTAGC 3' (reverso), que amplifican un segmento de 634 pb exclusiva de *M. colombiense* (GenBank: JN191386.1) de acuerdo a lo descrito en 5.2.1.

En la **Figura 6-15** se muestra el resultado de la PCR, donde claramente se observa un amplímero de 634 pb que solo amplifica en el DNA de *M. colombiense*. Como se

esperaba, hubo ausencia de amplificación utilizando DNA de *M. avium* ó en el control negativo en el que se utilizó agua en lugar de DNA.

Figura 6-15: Electroforesis de agarosa al 1.5% mostrando la amplificación del segmento JN191386.1 mediante PCR. 1: marcador de peso molecular 1Kb (Invitrogen); 2: *M. avium* 104; 3: *M. colombiense* 10B; 4: *M. colombiense* 57B; 5: *M. colombiense* 19B y 6: control negativo.

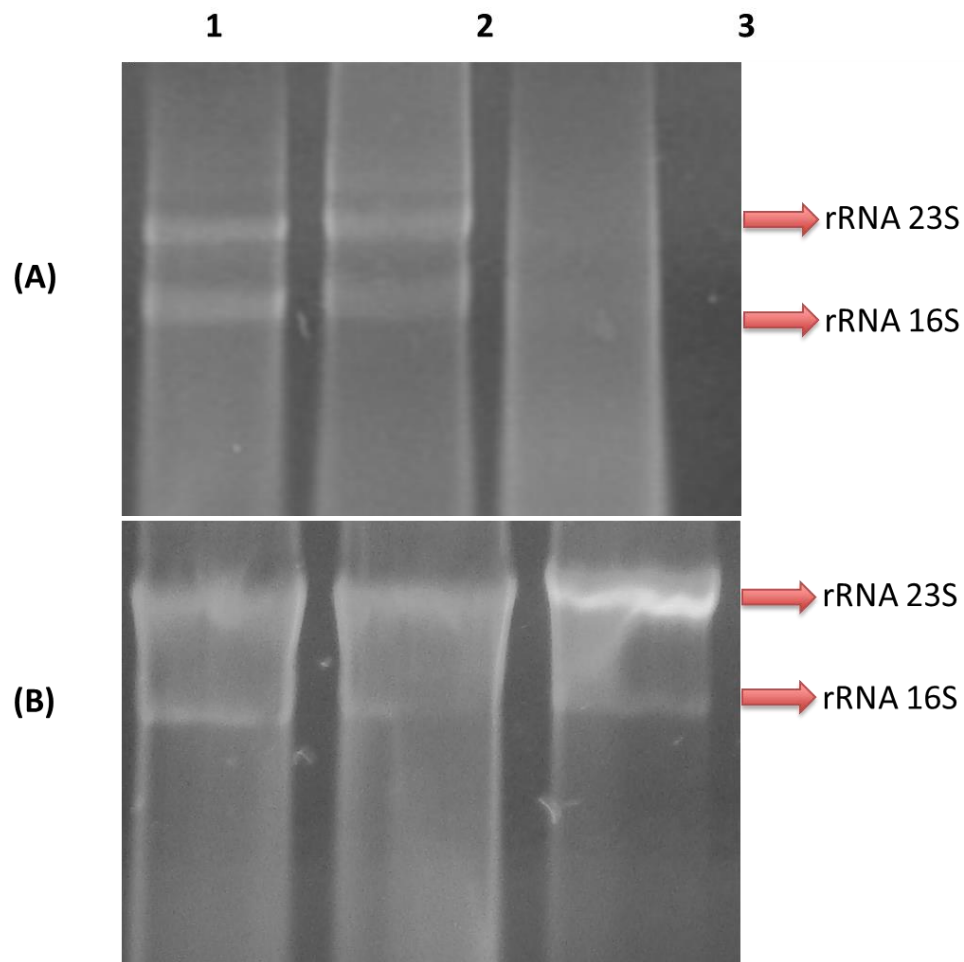


6.6.2 Aislamiento de RNA total de *M. colombiense*.

Después de la extracción, la integridad del RNA total de *M. colombiense* 19B, 57B y 10B obtenido a partir de células cultivadas en condiciones estándar y en medio de motilidad se determinó analizando entre 30ng-60 ng de la muestra en un gel de agarosa al 2,5% (**Figura 6-16**). En este análisis se puede evidenciar claramente las bandas de rRNA 23S y 16S, lo que sugiere integridad del ácido nucleico extraído.

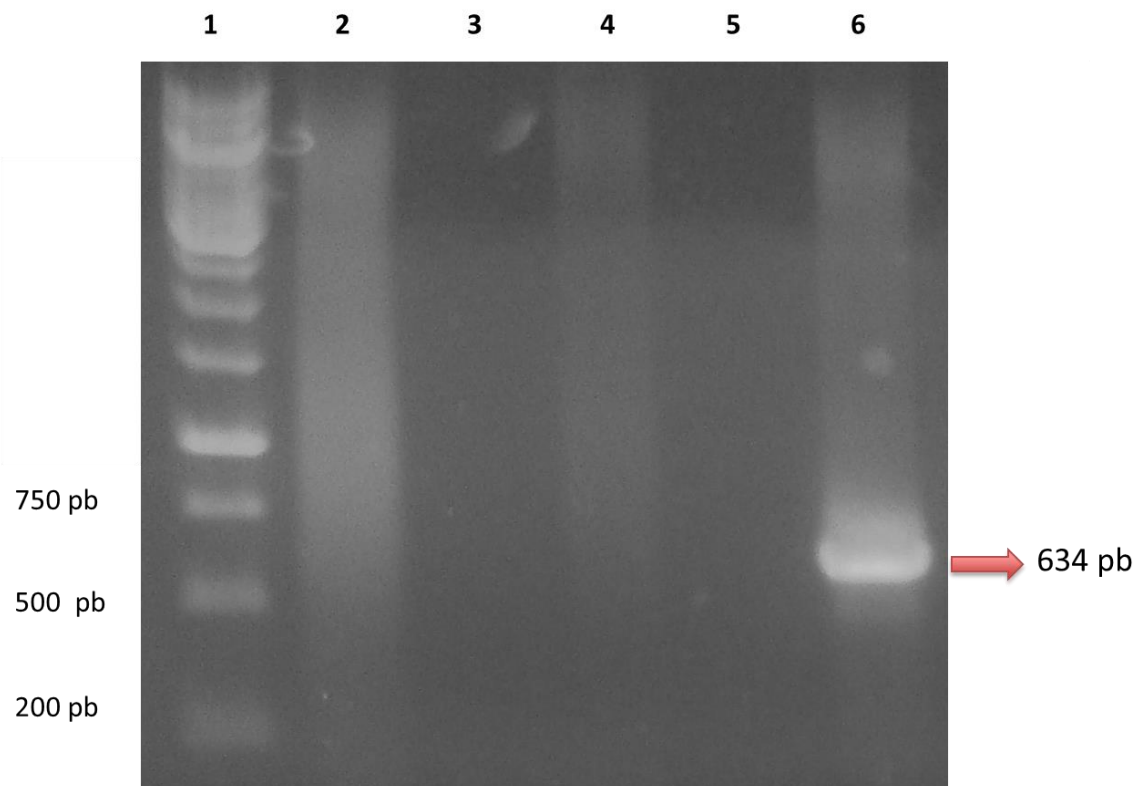
Debido a que a partir de este RNA se sintetizaría cDNA, nos aseguramos que estuviera libre de ADN contaminante, por esta razón se realizó el tratamiento con el Kit RNase free DNase tal como lo descrito en la parte experimental en el inciso 5.2.4. La eliminación del DNA de las muestras de RNA extraído se confirmó mediante la amplificación del segmento de 634 pb exclusivo de *M. colombiense* con los iniciadores J3. Como control positivo se utilizó DNA de *M. colombiense* 10B y como control negativo se utilizó agua DEPC.

Figura 6-16: Electroforesis en gel de agarosa al 2% del RNA extraído de las diferentes cepas de *M. colombiense*. (A) Cepas en crecimiento planctónico; 1: *M. colombiense* 19B (528,2ng/μL); 2: *M. colombiense* 57B (527,5ng/μL) y 3: *M. colombiense* 10B (521,9ng/μL) (B) Cepas en crecimiento motil; 1: *M. colombiense* 19B (1112,5/μL); 2: *M. colombiense* 57B (1056,4ng/μL) y 3: *M. colombiense* 10B (1160,4ng/μL)



En las muestras de RNA no se evidenció amplificación ni fluorescencia significativa respecto al control positivo, esto confirmó que el RNA aislado era óptimo para la síntesis de cDNA, pues se demostró la ausencia de DNA contaminante (**Figura 6-17**).

Figura 6-17: Electroforesis de productos de amplificación del segmento JN191386.1. a partir de RNA de *M. colombiense*. 1: marcador de peso molecular 1Kb; RNA tratado con DNAsa 2: RNA de *M. colombiense* 19B; 3: RNA de *M. colombiense* 57B; 4: RNA de *M. colombiense* 10B; 5: control negativo; 6: control positivo (DNA de *M. colombiense* 10B).



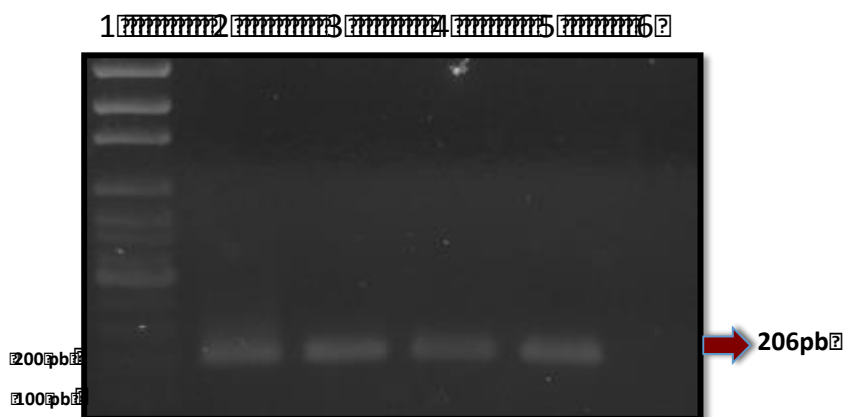
Después de su síntesis, el cDNA se cuantificó utilizando un NanoDrop 2000c Spectrophotometer (**Tabla 6-5**). A continuación, con el ánimo de verificar su correcta síntesis, se hizo una PCR convencional para amplificar un fragmento de 206 pb del 16sRNA ribosomal a partir del cDNA sintetizado de *M. colombiense*.

Tabla 6-5: Cuantificación de cDNA sintetizado de *M. colombiense* a partir de crecimiento planctónico y de motilidad.

Cepa	Concentración (ng/μL) cDNA (1/50) en condiciones planctónicas	Concentración (ng/μL) cDNA (1/50) en condiciones de motilidad
<i>M. colombiense</i> 10B	35,5	42,2
<i>M. colombiense</i> 19B	30,9	36,7
<i>M. colombiense</i> 57B	30,5	31,3

En la **Figura 6-18**, se observa la obtención de la banda de 206 pb utilizando cDNA sintetizado a partir de células cultivadas en condiciones planctónicas (**Figura 6-18**). La amplificación de este gen empleando los cDNAs, a partir de condiciones de motilidad dieron los mismos resultados (banda de 206pb), lo que indica que los cDNAs sintetizados eran óptimos para realizar los ensayos de cuantificación transcripcional de genes involucrados en la biosíntesis de GPLs

Figura 6-18: Electroforesis de productos de amplificación del gen 16sRNA a partir de cDNA de *M. colombiense*. 1: marcador de peso molecular 100pb; cDNA sintetizado a partir de condiciones planctónicas 2: cDNA de *M. colombiense* 19B; 3: cDNA de *M. colombiense* 57B; 4: cDNA de *M. colombiense* 10B; 5: control positivo (DNA *M. colombiense* 10B) y 6: control negativo.



6.6.3 Especificidad de cebadores diseñados para qPCR.

La especificidad de los iniciadores diseñados y descritos en la **Tabla 5-2**, se comprobó mediante PCR convencional utilizando como molde DNA de *M. colombiense* 10B. Las condiciones de amplificación fueron estandarizadas, pero en general solo se varió el T_m entre 58°C y 60°C para cada pareja de iniciadores.

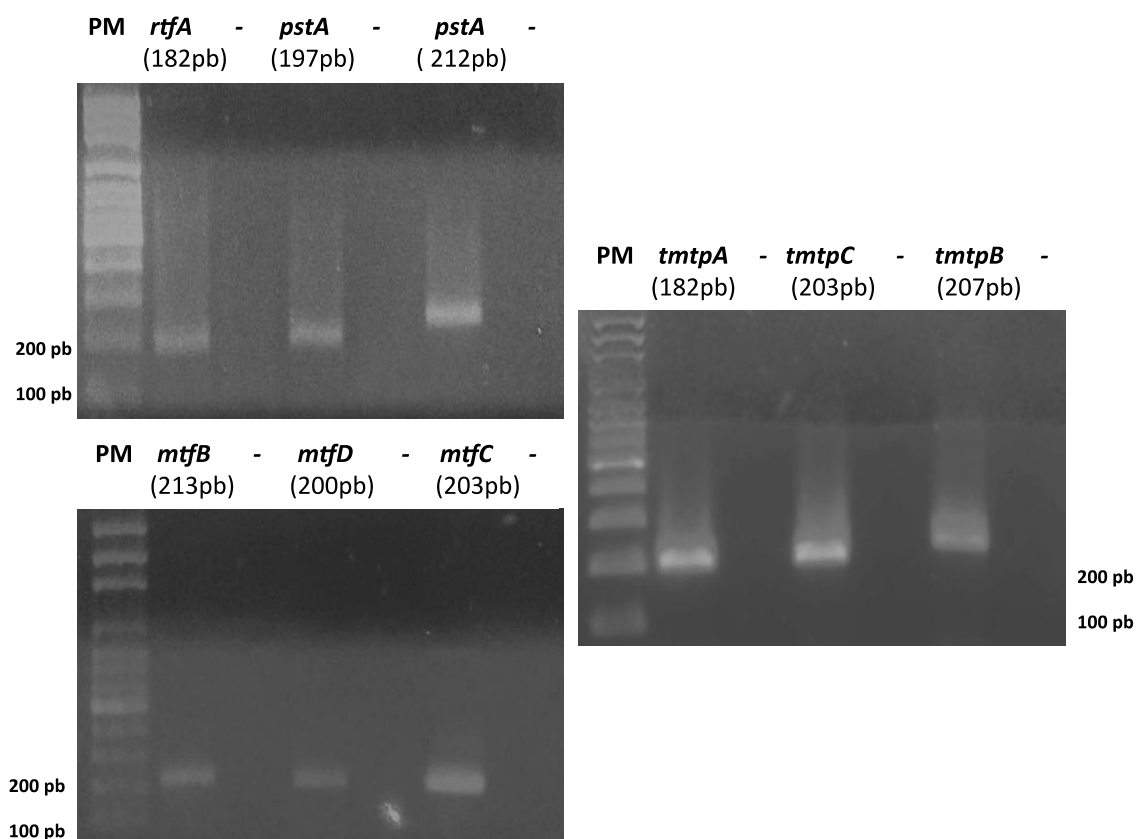
Se obtuvieron amplificaciones específicas con T_m de 58°C para los 9 genes probados. Como se observa en la **Figura 6-19**, el tamaño de los amplímeros obtenidos corresponden a los esperados.

6.6.4 Curvas de calibración de las qPCR y estandarización de condiciones de reacción.

Las curvas de eficiencia de los genes de estudio se realizaron empleando diluciones seriadas (1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10000) de DNA de *M. colombiense* 10B de una concentración inicial de 401,1ng/μL. Después de obtener eficiencias de amplificación

cercanas a 2,0 y curvas de melting apropiadas (**Tabla 6-6**), se procedió a cuantificar por cuádruplicado la expresión de los genes en las diferentes muestras de cDNAs.

Figura 6-19: Electroforesis de productos de amplificación a partir de DNA de *M. colombiense* 10B utilizando los iniciadores diseñados para el análisis transcripcional. 1: marcador de peso molecular 100 pb. La figura muestra los productos de amplificación de los 9 genes utilizados en los ensayos de expresión génica y su respectivo control negativo (agua como plantilla).



La **Tabla 6-7** muestra las condiciones de reacción qPCR establecidas para todos los genes. En el material **Anexo C (Figura C-1, Figura C-2 y Figura C-3)**, se encuentran las imágenes correspondientes a las curvas de amplificación, curvas de melting y rectas de calibración para cada uno de los genes analizados.

La eficiencia o capacidad de la reacción para duplicar el número de copias de las cadenas de DNA ó cDNA en cada ciclo fueron similares para los 9 genes de estudio y el gen de referencia, lo que permite realizar comparaciones confiables entre los valores

obtenidos para los genes analizados [131]. Adicionalmente, las curvas de melting presentan un único pico para cada amplificación, demostrando especificidad y altas tasas de anillamiento iniciador-cDNA [132] (**Tabla 6-6**)

Tabla 6-6. Eficiencias de reacción y temperatura de melting para los genes involucrados en la biosíntesis de glicopeptidolípidos.

Gen	Temperatura de melting	Eficiencia
<i>pstA</i>	87,5	1,701
<i>gtfA</i>	90,5	1,698
<i>rtfA</i>	87,0	1,709
<i>mtfB</i>	87,5	1,728
<i>mtfC</i>	87,0	1,908
<i>mtfD</i>	88,5	1,852
<i>tmtpC</i>	86,0	1,718
<i>tmtpA</i>	89,0	1,651
<i>tmtpB</i>	87,5	1,734
<i>16sRNA</i>	86,5	1,736

Tabla 6-7: Programa de amplificación estandarizado para los genes estudiados por qPCR (temperatura de enfriamiento a 37°C).

Gen	Ciclos	Tanillamiento (°C)	Pre-incubación	Desnaturalización	Anillamiento	Extensión	Curvas melting
<i>pstA</i> , <i>gtfA</i> , <i>rtfA</i> , <i>mtfB</i> , <i>mtfC</i> , <i>mtfD</i> , <i>tmtpC</i> , <i>tmtpB</i> , <i>tmtpA</i> , <i>16sRNA</i>	40	58	95°C por 5 min	95°C por 10 seg	58°C por 10 seg	72°C por 15 seg	95°C con incrementos de 0,5°C cada 5 seg

6.6.5 Cuantificación de la transcripción de genes involucrados en biosíntesis de GPLs de *M. colombiense* en condición planctónica y de motilidad.

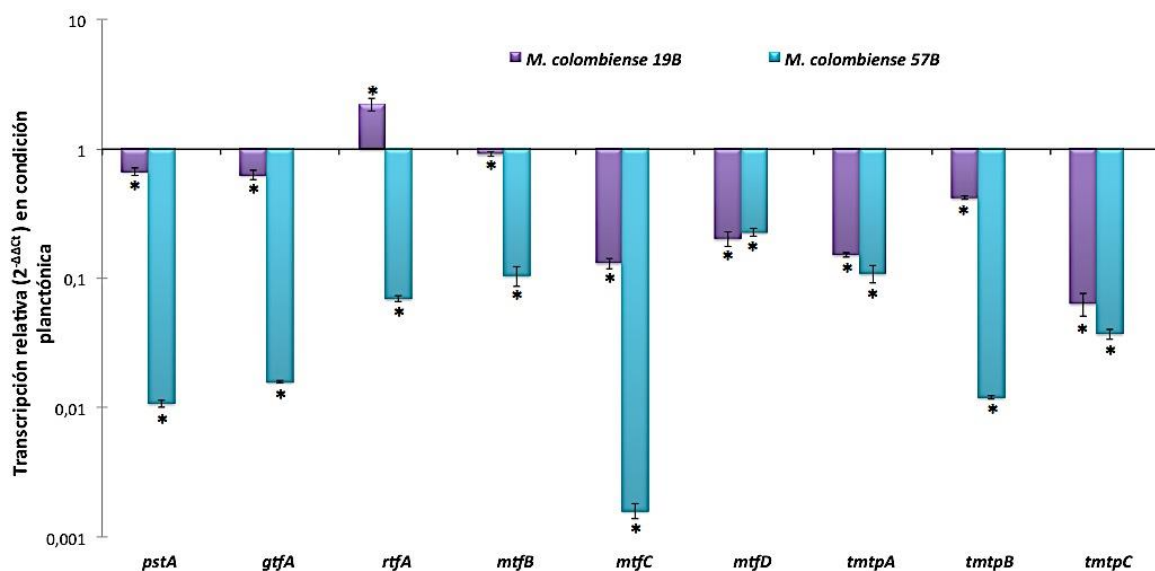
Para los ensayos de qPCR se empleó el gen de referencia *rrs* (16sRNA) de *M. colombiense* 10B (CECT 3035), el que mostró altos valores de transcripción en ambas condiciones de crecimiento (planctónico y motilidad) y valores de eficiencia cercanas a los genes de interés, lo que lo hizo un candidato adecuado como gen de referencia en nuestro estudio.

La cepa *M. colombiense* 10B en medio planctónico fue tomada como muestra de referencia para estimar el cambio en el patrón transcripcional de las demás cepas y/o condiciones de cultivo. Se escogió la cepa 10B al ser la cepa tipo CECT 3035 cuyo genoma está reportado en la base de datos del NCBI Whole Genome Shotgun (WGS), del cual se diseñaron los iniciadores para el análisis de transcripción.

Adicionalmente, se eligió la condición planctónica como referencia debido a que bajo este estado de crecimiento, las cepas de *M. colombiense* expresan menores niveles de GPLs, como se mostró en los resultados del componente biológico y microbiológico (**Figura 6-11 y Tabla 6-3**), y de esta manera facilitar el análisis de la sobre-expresión génica en condiciones de motilidad.

Las células planctónicas de *M. colombiense* 57B mostraron una disminución en la transcripción de los 9 genes estudiados, especialmente los que codifican la péptido sintetasa (*pstA*), glicosiltransferasa (*gtfA*), metiltransferasas (*mtfB/mtfC*) y transportadores de lípidos (*tntpA/tntpB/tntpC*) (**Figura 6-20**).

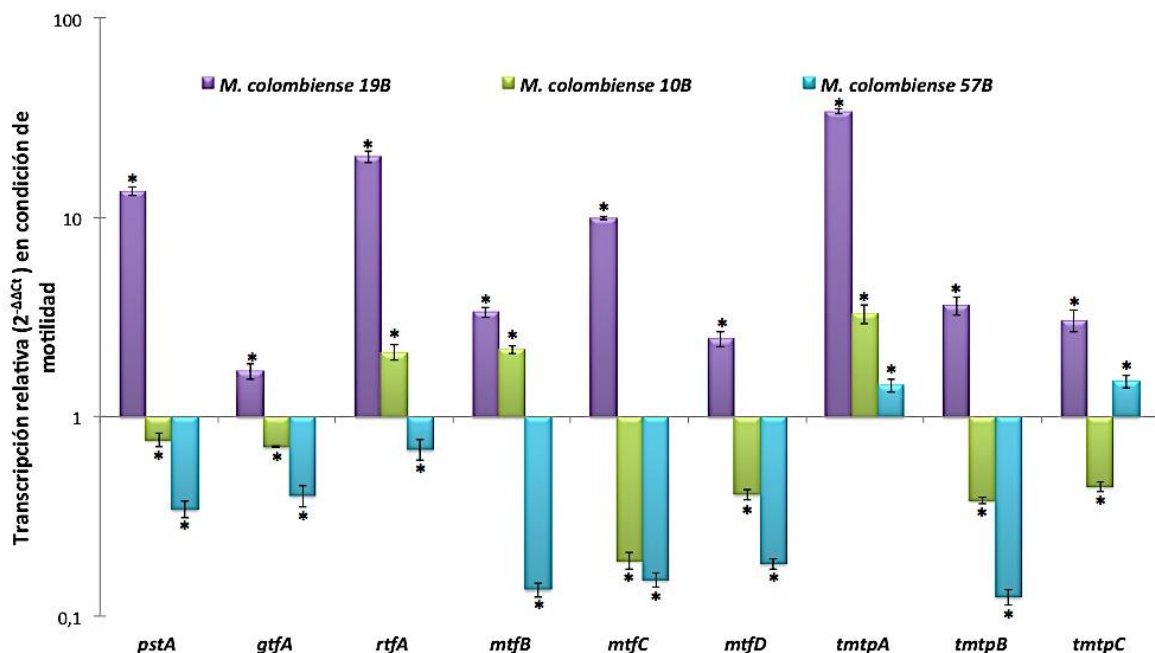
Figura 6-20: Expresión relativa de genes involucrados en la biosíntesis de GPLs en condiciones planctónicas. El número 1 en el eje de las abscisas corresponde a la expresión de los genes de estudio en la cepa control *M. colombiense* 10B en condición planctónica, mientras los números enteros representan sobreexpresión genética y los decimales disminución en la expresión. *Diferencia estadística significativa $P<0.05$.



En el caso de las células planctónicas de la cepa 19B, los niveles de transcripción de los genes *rtfA* (glicosiltransferasa), *pstA* (péptido sintetasa), *gtfA* (glicosiltransferasa) y *mtfB* (metiltransferasa) fueron similares, mientras los niveles de transcripción del resto de genes disminuyeron notoriamente en comparación de la cepa control 10B en crecimiento planctónico (**Figura 6-20**).

Por otra parte, la cepa 19B de *M. colombiense* en condiciones de motilidad mostró un incremento del nivel transcripcional en todos los genes seleccionados en comparación con la cepa 10B cultivada bajo condiciones planctónicas (muestra de referencia). (**Figura 6-21**).

Figura 6-21: Expresión relativa de genes involucrados en la biosíntesis de GPLs en condiciones de motilidad. El número 1 en el eje de las abscisas corresponde a la expresión de la cepa control *M. colombiense* 10B en condición planctónica, mientras los números enteros representan sobreexpresión genética y los decimales disminución en la expresión. *Diferencia estadística significativa $P < 0.05$



En el caso de la cepa 10B, la transcripción de los genes *rtfA*, *mtfB* y *tmtpA* resultó mayor mientras los genes *mtfC*, *mtfD*, *tmtpB*, *tmtpC*, *pstA* y *gtfA* mostraron menores niveles de transcripción en comparación de las células de la cepa 10B en crecimiento planctónico (**Figura 6-21**).

Finalmente, los niveles de transcripción de todos los genes de la cepa 57B en crecimiento motil disminuyeron, excepto *tmtpA* and *tmtpC* que presentaron mayores niveles de transcripción respecto a las células de la cepa 10B en crecimiento planctónico (**Figura 6-21**).

Curiosamente, el gen *pstA* que codifica una péptido sintetasa indispensable para la síntesis del núcleo peptídico del GPL, mostró menor transcripción en las cepas de 19B y 57B en crecimiento planctónico, en comparación de las mismas cepas al crecer en condiciones de motilidad.

De aquí se podría deducir que posiblemente en condiciones planctónicas la expresión del gen *pstA* es constitutiva, mientras en el medio de motilidad se necesitaría del aumento de su transcripción, lo que de alguna forma confirmaría la expresión de GPLs en *M. colombiense* aumentaría y posiblemente favorecería la motilidad tal como sucede en otras especies de MAC [13].

Por otro lado, la cepa 19B en condiciones de motilidad es la que presenta mayor transcripción del gen *pstA*, lo que era de esperarse, al ser 19B la cepa con mayor capacidad de deslizarse en medios de agarosa y mayor producción de GPLs (**Figura 6-3, Figura 6-4 y Figura 6-11**).

Por lo contrario, la cepa 57B es la que presenta una menor transcripción del gen *pstA* en ambas condiciones de crecimiento, lo que generaría una menor producción de GPLs (**figura 6-11**) y con la consiguiente disminución de la capacidad de deslizamiento (**Figura 6-3, Figura 6-4**), en comparación a las cepas de morfotipo liso (19B y 10B).

La disminución de la transcripción de *pstA* en la cepa 57B en estado planctónico es mucho mayor en comparación a las mismas células en condiciones de motilidad.

Este resultado daría a entender que cuando se presentan condiciones para el deslizamiento (motilidad) como lo sería el crecimiento en placas de 7H9-OADC-0.35% agarosa, se fuerza la producción de GPLs, como lo pudimos evidenciar en el análisis por CCF (**Figura 6-11**) donde se observa un mayor contenido de GPL en los extractos lipídicos de la cepa 57B crecida en medio de motilidad en comparación a células planctónicas.

Estos resultados corroboran que probablemente la expresión de la péptido sintetasa es indispensable para la producción de GPLs, lo que facilitaría la capacidad motil de *M. colombiense*, como se observó para las cepas de *M. colombiense* en los ensayos de motilidad y se correlaciona con los resultados obtenidos en qPCR, pues la motilidad aumenta la transcripción de *pstA* y la producción de GPLs (**Figura 6-11 y Figura 6-21**).

En cuanto a los genes *tmtpA*, *tmtpB* y *tmtpC* responsables del ensamble y exportación del GPL en la membrana citoplasmática, se observa que en crecimiento motil hay una sobre-expresión *tmtpA* en todas las cepas, aunque es notoria la mayor sobre-expresión en la cepa 19B al ser la cepa con mayor producción de GPLs, requiere mayor actividad de transporte (**Figura 6-9** y **Figura 6-11**).

La expresión de los 3 transportadores disminuyen en medio planctónico, por lo que se supone los GPLs necesitan ser menos transportados al ser menos producidos en condiciones planctónicas como lo muestra el análisis por CCF (**Figura 6-11**).

En general la cepa 19B presenta una mayor sobre-expresión de los genes *tmtpA*, *tmtpB* y *tmtpC* en comparación a la muestra patrón (células planctónicas de la cepa 10B) y las cepas 57B y 10B en condiciones de motilidad, lo que es de esperarse al ser 19B la cepa con mayor capacidad de motilidad (**Figura 6-3** y **Figura 6-4**), mayor sobre-expresión del gen *pstA* (**Figura 6-21**), y mayor producción de GPLs (**Figura 6-11**) requiriendo mayor actividad de sus transportadores.

En crecimiento planctónico los niveles de transcripción de estos genes (*tmtpA*, *tmtpB* y *tmtpC*) en la cepa 19B son menores, lo que supone que al haber una menor producción de GPLs se hace menor su transporte (**Figura 6-11** y **Figura 6-20**).

La variante rugosa 57B muestra una sobre-expresión de los genes *tmtpA* y *tmtpC* en crecimiento motil, sobre-expresión que es mucho menor a la exhibida por las demás cepas, lo que al final se ve reflejado en un menor aumento de la producción de GPLs (**Figura 6-11**), que trae como consecuencia una baja capacidad de deslizamiento en el medio de motilidad (**Figura 6-3** y **Figura 6-4**).

De manera similar, la cepa 57B en condiciones planctónicas muestra una menor expresión de los transportadores, lo que conlleva a menor producción de GPLs (**Figura 6-9**), lo que también se puede correlacionar con una baja actividad del gen *pstA* (**Figura 6-20**), lo que genera menor producción de GPLs requiriendo menor actividad de los transportadores membranales TmtpA y TmpC.

El gen *tmtpB*, para ambas condiciones de crecimiento presenta una disminución de la expresión al ser comparado con los niveles de transcripción de la muestra patrón (células

planctónicas 10B), pero es notorio que en medio motil esta disminución de la transcripción no es tan drástica. Por lo tanto, esta cepa de morfología rugosa mostraría menor producción de GPLs (**Figura 6-11**) y menor motilidad (**Figura 6-3 y Figura 6-4**) en comparación de las cepas 10B y 19B de morfotipo liso, como los resultados obtenidos en este trabajo, posiblemente producto de la baja expresión de la péptido sintetasa (*PstA*) y las proteínas involucradas en el transporte de estos glicolípidos (*TmtpB/TmtpC/TmtpA*).

En cuanto a la cepa 10B, en condiciones de motilidad muestra una disminución en los niveles de expresión de los transportadores, no tan drástica en comparación a las células en crecimiento planctónico (**Figura 6-21**). Mientras *tmtpA* presenta una sobre-expresión en motilidad, lo que favorecería el ensamble y la exportación de GPLs en la membrana generando una mayor producción de GPLs como se observa la **Figura 6-11**, donde se aprecian 4 bandas con desplazamiento cromatográfico similar a GPLs de *M. avium* en condición motil, pero en crecimiento estándar solo se muestran 3 bandas.

Por otro lado el gen *gtfA*, que codifica la glicosiltransferasa responsable de la adición de la 6-deoxitalosa al hidroxilo de D-*allo*-treonina del núcleo lipopéptidico en especies de MAC, muestra una sobre sobre-expresión en la cepa 19B en crecimiento motil, mientras en las cepas 10B y 57B crecidas en la misma condición muestran una disminución en la transcripción.

En general, la cepa 19B crecida en medio de motilidad, presentó la mayor sobre-expresión del gen *gtfA*, posiblemente al ser la cepa con mayor producción de GPLs y presentar mayores niveles de transcripción del gen *pstA*, lo que supone un mayor procesamiento y síntesis de GPLs, lo que requiere mayor acción de la enzima glicosiltransferasa. En condiciones planctónicas, la cepa 19B exhibe disminución en los niveles de *gtfA*, lo que supone menor producción del corazón peptídico (menores niveles de transcripción del gen *pstA*, **Figura 6-20**) y menor síntesis de GPLs (**Figura 6-11**).

La cepa 57B, muestra bajos niveles de expresión del gen *gtfA* en ambas condiciones de crecimiento, lo que también se podría asociar a bajos niveles de transcripción de *pstA* (fundamental para la síntesis del péptido del GPLs), que se refleja en una menor producción de GPLs. Pero en condiciones de motilidad el decrecimiento de la transcripción de *gtfA* en la cepa 57B no es tan drástico respecto a la muestra patrón, lo que se vería reflejado en una mayor producción de GPLs en células cultivadas en el

medio de motilidad, como lo observado mediante los experimentos de CCF (**Figura 6-11**).

Mientras la cepa 10B, muestra niveles similares de transcripción del gen *gtfA* en ambas condiciones de crecimiento (planctónico y motil), al igual que el gen *pstA*. Aunque muestra mayores niveles de expresión tanto de *pstA* y *gtfA* en comparación de la cepa 57B, pero menores niveles de transcripción si se contrasta con la cepa 19B, lo que se podría relacionar con su capacidad motil intermedia entre las cepas de *M. colombiense* (**Figura 6-3** y **Figura 6-4**) y producción de GPLs favorecida bajo condiciones de motilidad (**Figura 6-11**).

En gen *rtfA* (codifica una ramnosiltransferasa requerida para transferir una L-ramnosa a la 6-deoxitalosa), mostro sobre-expresión en las cepas 19B y 10B en crecimiento motil, lo que nos indica que efectivamente bajo esta condición se están produciendo GPLs en mayor proporción.

Por ejemplo la cepa 19B, mostró mayores niveles de transcripción de este gen en condición motil en comparación de las otras cepas de *M. colombiense*, siendo la cepa de mayor producción de GPLs, como se evidencia en las CCF de la **Figura 6-11**, además en esta condición de crecimiento hay mayor expresión del gen de la péptido sintetasa (*pstA*), generando alta producción del residuo peptídico del GPLs y requiriendo mayores niveles de acción enzimática de la ramnosiltransferasa para la elaboración de GPLs polares [15].

En medio planctónico, 19B también mostró mayor expresión de *rtfA* en comparación de la muestra control (células planctónicas de cepa 10B) y 57B, lo que se ve reflejado en la mayor producción de GPLs como se muestra en la CCF de la **Figura 6-9**, pues se observa mayor variabilidad y contenido de GPLs.

Por su parte, la cepa 10B muestra una sobre-expresión del gen *rtfA* (codifica la ramnosiltransferasa requerida para la generación de ssGPLs) en motilidad en comparación de las células planctónicas, lo que puede relacionarse con mayor producción y variabilidad de GPLs (mayor número de señales de GPLs) (**Figura 6-11**).

Por el contrario, la cepa 57B muestra una disminución de la expresión del gen *rtfA* en ambas condiciones de crecimiento, siendo menor el decrecimiento de la transcripción en

condiciones de motilidad, lo que parcialmente explicaría el aparente aumento de su producción de GPLs en motilidad (**Figura 6-11**).

Respecto a los genes *mtfB*, *mtfC* y *mtfD* que codifican para metiltransferasas, la cepa 19B los sobre-expresó en condiciones en motilidad. La mayor actividad de la péptido sintetasa (*pstA*) en esta condición de crecimiento resulta en una mayor producción de GPLs, los que requerirían metilaciones específicas para su maduración y transporte, como se ve reflejado en la sobre-expresión de los genes codificantes de los transportadores membranales.

En cambio, en condiciones planctónicas los niveles de *mtfC* y *mtfD* de 19B fueron menores que la cepa control 10B en crecimiento planctónico, lo que se puede asociar con una menor producción del residuo peptídico del GPL consecuencia de la menor expresión de *pstA*, en comparación a las condiciones de motilidad.

La cepa 10B en condiciones de motilidad, muestra sobre-expresión en el gen *mtfB* mientras los genes *mtfC* y *mtfD* presentan una disminución en los niveles de transcripción, pero el aumento de la expresión de *mtfB* de alguna manera contrarresta el descenso de la expresión del gen *mtfC*, pues ambos genes codifican para una metiltransferasa que cataliza la O-metilación en la posición 4 de la ramnosa del GPL.

Por tanto el aumento de la expresión de *mtfB* al igual que *rffA*, tal vez favorezcan la variabilidad de GPLs en condición motil, pues en la CCF comparativa de la **Figura 6-11**, se observan mayor número de señales de GPLs para esta cepa, si se compara con las señales que se visualizan en los extractos lipídicos tomados de células planctónicas.

La cepa 57B muestra la mayor disminución en la expresión de los genes *mtfB*, *mtfC* y *mtfD* tanto en crecimiento planctónico y motil; es evidente que esta cepa no requiere altos niveles de transcripción de estos genes para la modificación del GPLs, lo cual concuerda con los bajos niveles de transcripción de otros genes involucrados en la biosíntesis del GPLs, como por ejemplo, el gen *pstA*, *gtfA*, *tmtA* (**Figura 6-20** y **Figura 6-21**), lo que trae como consecuencia la menor producción de GPLs (**Figura 6-11**).

Es importante destacar que el nivel de expresión del gen *mtfC* en la cepa 57B en condición planctónica muestra una drástica disminución respecto a motilidad en comparación a células en crecimiento planctónico de la cepa 10B.

Como se nombró anteriormente los nsGPLs maduros (metilados) son el sustrato para la formación de ssGPLs [15], por lo tanto, en condiciones de motilidad la cepa 57B produce GPLs metilados en mayor proporción que en condición planctónica, lo que favorecería la producción de GPLs polares. La anterior condición se puede asociar con mayores niveles de expresión del *rtfA* (codifica la ramnosiltransferasa requerida para la generación de ssGPLs) en condiciones motiles, lo que se refleja en una señal más intensa de GPL en la CCF de la **Figura 6-11**, para esta cepa bajo este estado de crecimiento.

En general, las cepas 10B y 19B de morfología de colonia lisa (**Figura 6-2**) mostraron mayores niveles de transcripción de los genes involucrados en la biosíntesis de GPLs estudiados en este trabajo, mientras la cepa 57B de morfotipo rugoso (**Figura 6-2**) mostró los menores niveles de expresión, lo cual se evidencia en la CCF de la **Figura 6-11**. La conversión de cepas lisas a rugosas es en parte consecuencia de la ausencia ó modificación de los GPLs debido a mutaciones espontáneas dentro del grupo de genes involucrados en la biosíntesis de GPLs [23] [56][76].

Por medio de los resultados obtenidos en el análisis transcripcional de algunos genes involucrados en la biosíntesis de GPLs, junto con los obtenidos en el componente microbiológico y bioquímico, se puede establecer una estrecha y directa relación con la producción de GPLs y diferentes fenotipos en cepas de *M. colombiense*, como la morfología de colonia, la motilidad por deslizamiento y la formación de biopelículas.

7. Conclusiones y perspectivas

7.1 Conclusiones

En este trabajo se analizó el morfotipo de colonia, la capacidad de motilidad por deslizamiento y de formación de biopelículas de diferentes cepas de *M. colombiense*. Se observó que las cepas 10B y 19B de morfología de colonia lisa tienen capacidad de deslizamiento en un medio de cultivo sólido hidrofílico y de formación de biopelículas en superficies de poliestireno, a diferencia de la cepa 57B de morfología rugosa, la cual presentó una disminución muy pronunciada en estas características fenotípicas.

Igualmente se determinó por medio del ensayo de test colapso de gota que cepas de *M. colombiense* no secretan algún tipo de biosurfactantes que favorezca su capacidad motil, es decir, su deslizamiento se favorece por la presencia de glicolípidos de envoltura como GPLs, al igual que en otras cepas de MAC.

Por medio del perfil lipídico mediante CCF se determinó que cepas de morfología lisa presentan mayor contenido y variabilidad de GPLs en comparación con la variante natural rugosa 57B. Por lo tanto, se puede establecer una estrecha relación con la alta producción y variabilidad de GPLs, la capacidad de motilidad por mecanismos de deslizamiento, la formación de biopelículas y la morfología de colonia lisa en cepas de *M. colombiense*.

Se encontró que las secuencias nucleotídicas relacionadas con la biosíntesis de GPLs en *M. colombiense* tienen en su mayoría un porcentaje de identidad superior al 80% respecto a los mismos genes encontrados en *M. avium* 104. Por su parte, la biosíntesis de GPLs en *M. colombiense* probablemente sigue un mecanismo similar al que se ha reportado para *M. avium*; los genes relacionados con la biosíntesis de estos glicolípidos

se encuentran agrupados entre sí en un clúster génico en el contig 00002A, 00003A, 00007 pero la mayoría en el 00001 del genoma reportado para *M. colombiense* CECT 3035.

Los estudios de transcripción de genes relacionados con la síntesis de GPLs sugieren que la expresión de los genes de estudio se favorecen cuando las células crecen bajo condición de motilidad. Además las cepas morfología de colonia lisa muestran mayores niveles de transcripción, generando mayor producción y variabilidad de GPLs, en comparación de la variante rugosa. En crecimiento motil, hay mayor producción y variabilidad de GPLs en *M. colombiense*, lo cual se podría asociar a una mayor actividad de las enzimas RtfA y MtfB, pero son necesarias demostraciones experimentales adicionales.

7.2 Perspectivas

El análisis transcripcional de los genes involucrados en la síntesis y modificación de los GPLs por qPCR en cepas de *M. colombiense* permitió establecer una relación directa entre la composición de GPLs de pared con la morfología de colonia y la formación de BP. Por lo tanto, se podría analizar la regulación génica de la biosíntesis de los GPLs y cómo esto afecta diferentes fenotipos de *M. colombiense*.

Es necesario determinar las características estructurales de los GPL presentes en esta especie, la identidad de los monosacáridos que componen el oligosacárido hapténico, para lo cual son necesarios ensayos de caracterización tanto cromatográfica como de espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear.

Dadas las importantes contribuciones en la fisiología y patogénesis de MNT, los genes que participan en la biosíntesis y regulación de GPLs podrían ser potenciales candidatos para medicamentos contra la infección de micobacterias ambientales. Es importante evaluar la antigenicidad de los GPL presentes en *M. colombiense* y su relación con la virulencia e infección en pacientes VIH positivos.

Finalmente, a largo plazo los resultados de la presente propuesta podrían contribuir al diseño de nuevos medicamentos que permitan acortar el tratamiento y mejorar la calidad

de vida de los pacientes, especialmente los VIH positivo, dicha tarea es de gran importancia dado el alto nivel de las infecciones micobacterianas en la actualidad.

8. Divulgación y presentaciones en eventos científicos

Los resultados de la presente investigación han sido dados a conocer en instancias nacionales e internacionales con una aceptación muy positiva. Los resultados de la investigación han sido presentados en eventos y reuniones científicas:

- Presentación tipo Poster en el *XXIX Congreso Latinoamericano de Química*, realizado en Cartagena, Colombia entre el 28 de septiembre y el 1 de octubre de 2010:

Título: Análisis del carácter invasivo y composición glicolípida de aislados clínicos de *Mycobacterium colombiense*.

Autores: Milena Maya Hoyos, Juan Nicolas Tarquino Chía, John Emerson Leguizamón, Carlos Yesid Soto Ospina.

- Presentación tipo Poster en el VI congreso internacional tuberculosis, lepra y micobacteriosis SLAMTB 2012, realizado en Bucaramanga, Colombia entre el 26-28 de septiembre de 2012:

Título: Sliding motility and biofilm formation in *Mycobacterium colombiense* and its relationship to the composition of glycopeptidolipids.

Autores: Maya M, Tarquino J. N, Soto C. Y,

- Presentación tipo Poster en el *XXI Congreso Latinoamericano de Microbiología*, realizado en Santos, Brasil entre el 28 de octubre y el 1 de noviembre de 2012:

Título: Motilidad y formación de biopelículas en *Mycobacterium colombiense* y su relación con la composición de glicopeptidolípidos.

Autores: Milena Maya Hoyos; Juan Nicolas Tarquino Chia; Jimmy Esneider Rodríguez Murillo; Carlos Yesid Soto Ospina.

Manuscrito en preparación**Sliding motility, biofilm formation and glycopeptidolipid production of
Mycobacterium colombiense strains**

Milena Maya¹, John Leguizamón¹, Leonardo Mariño² and Carlos Y. Soto¹

Revista Journal of Bacteriology (JB)

Anexo A: Componente microbiológico y bioquímico

Tinción diferencial de Ziehl-Neelsen

Es una tinción diferencial para identificar bacterias ácido-alcohol resistentes como las micobacterias. Se realizó mediante el siguiente procedimiento:

- a. Preparar un frotis de cada una de las cepas micobacterianas a ensayar, sobre un portaobjetos.
- b. Fijar por calentamiento.
- c. Cubrir la preparación con unas gotas de fucsina fenicada filtrada.
- d. Calentar hasta emisión de vapores tres veces durante 5 minutos, sin permitir ebullición.
- e. Dejar enfriar y lavar con abundante agua.
- f. Cubrir durante 3 minutos con ácido clorhídrico al 3% en etanol.
- g. Lavar con agua.
- h. Cubrir con unas gotas de azul de metileno durante 1 minuto.
- i. Lavar con agua y dejar secar al aire.
- j. Observar al microscopio.

Figura A-1: Tinción diferencial de Ziehl-Neelsen de *M.colombiense* 10B

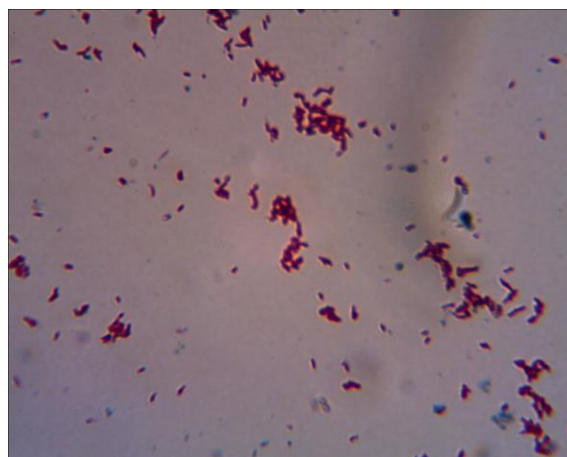


Figura A-2: Marcadores de peso molecular usados en el desarrollo de la investigación. De izquierda a derecha: GeneRuler 100 bp DNA ladder y 1 kb DNA ladder.

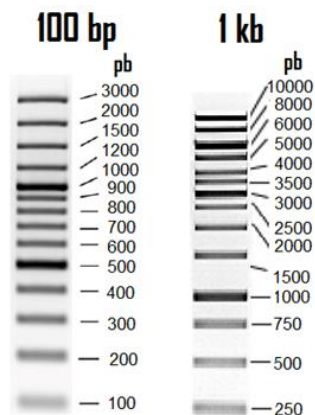
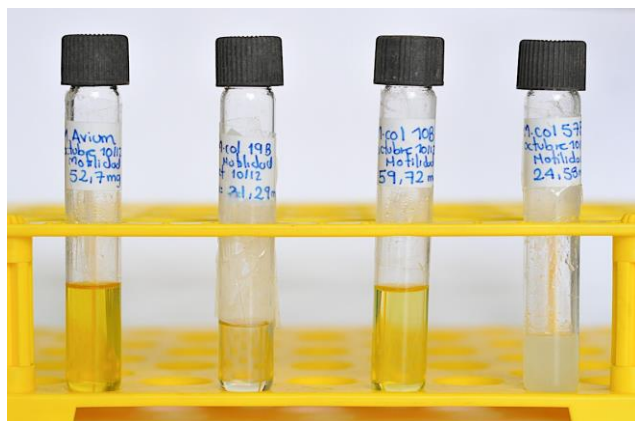


Figura A-3: Extractos lipídicos totales de *M. colombiense* obtenidos mediante una extracción con solventes orgánicos de las micobacterias a partir de crecimiento en condiciones planctónicas y de motilidad.

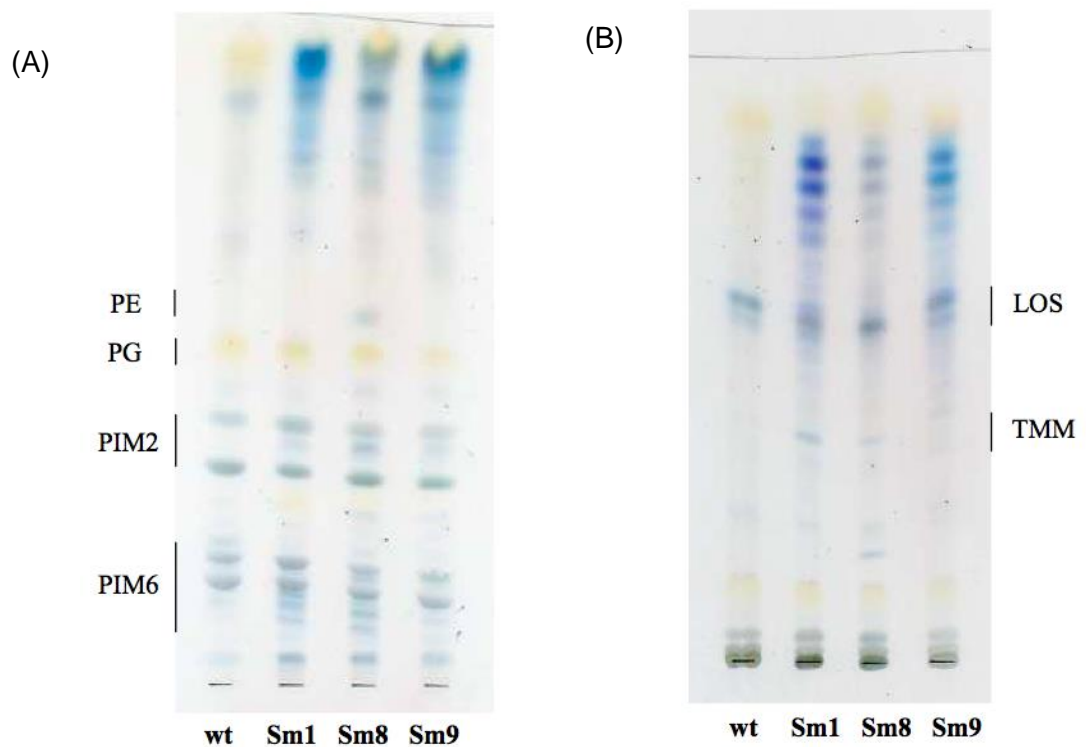


Extracto lipídico a partir de
bacterias crecidas en medio
de motilidad



Extracto lipídico a partir de
bacterias crecidas en
condición planctónica

Figura A-4: Perfil cromatográfico del extracto lipídico de *M. smegmatis* ATCC607 tipo silvestre y variantes lisas naturales (Sm) por CCF. (Tomado de Kocíncová *et al.*, 2008). Análisis de los fosfolípidos PE, PG, LOS, TMM y PIM usando como sistema de solventes: (A) cloroformo/metanol/agua (60:35:8) (v/v/v); (B) cloroformo/metanol/agua 60:16:2 (v/v/v) revelados con 1% de antrona en H₂SO₄ seguido de calentamiento a 110°C [93].



Anexo B: Búsqueda de genes relacionados con la biosíntesis de GPL en *M. colombiense*.

Tabla B-1: Resultados BLASTn contra genoma de *M. colombiense* CECT 3035

Gen en <i>M. avium</i> 104 Reference Sequence: NC_008595.1 GenBank: CP000479.1	Nombre secuencia BLASTn <i>M.</i> <i>colombiense</i>	Contig y posición	Puntaje de alineamiento	Porcentaje de identidad	E valor
<i>mmps4</i> (MAV_3247) Proteína miembro de la familia MmpS, requerida para el ensamble y transporte de GPLs en la membrana proteína MmpS4	MCOL_V218616 Proteína de membrana Proteína MmpS4 ID: EJO86937.1	Contig 00001 (20977-21456)	494	88	4e-140
<i>mmpL4a</i> (MAV_3248) Proteína miembro de la familia MmpS, requerida para el ensamble y transporte de GPLs en la membrana Proteína MmpL4A	MCOL_V218621 Proteína de la familia de transportadores ID: EJO86938.1	Contig 00001 (21453-24344)	2979	85	0.0
<i>mmpL4b</i> (MAV_3249) Proteína miembro de la familia MmpS, requerida para el ensamble y transporte de GPLs en la membrana Proteína MmpL4B	MCOL_V218626 Proteína mmpL4_2 ID: EJO86939.1	Contig 00001 (24491-27352)	2983	86	0.0
<i>Rv1174</i> (MAV_3362) Proteína hipotética desconocida función	MCOL_V219166 Proteína hipotética desconocida función ID: EJO87047.1	Contig 00001 (146477..146815)	510	94%	3E-145
<i>rmIA</i> (MAV_4820) Putativa glucosa-1-fosfato-timidiltransferasa Proteína RmIA	MCOL_V201710 putativa glucosa-1-fosfato-timidiltransferasa ID: EJO90905.1	Contig 00002A complementaria(355904..356779)	1192	91%	0.0
<i>rmIB</i> (MAV_3269) Putativa dTDP-glucosa-4,6-deshidrogenasa Proteína RmIB	MCOL_V218756 Proteína de la familia deshidrogenasa ID: EJO86965.1	Contig 00001 Complementaria (55306..56409)	1020	84%	0.0
<i>mtfA</i> (MAV_3268)	Este gen no se encontró en el genoma de <i>M. colombiense</i> 3035 CECT				

3-O-metil-transferasa Proteína MtfA					
mtfB (MAV_3266) 4-O-metil-ramnosiltransferasa Proteína MtfB	MCOL_V218751 O-metiltransferasa de macrocina ID: EJO86964.1	Contig 00001 Complementaria (54258-55064)	937	87	0.0
mtfC (MAV_3261) 4-O-metil-ramnosiltransferasa Proteína MtfC	MCOL_V218736 O-metiltransferasa de macrocina ID: EJO86961.1	Contig 00001 Complementaria (50267-51070)	931	88	0.0
mtfD (MAV_3260) 3-O-metil-ramnosiltransferasa Proteína MtfD	MCOL_V218731 Proteína MtfD ID: EJO86960.1	Contig 00001 Complementaria (49351-50106)	887	88	0.0
gtfA (MAV_3265) 6-deoxitalosiltransferasa Proteína GtfA	MCOL_V218746 Proteína de la familia glicosiltransferasa ID: EJO86963.1	Contig 00001 Complementaria (52857-54125)	1513	89	0.0
gtfB (MAV_3258) Ramnosiltransferasa Proteína GtfB	Este gen no se encontró en el genoma de <i>M. colombiense</i> 3035 CECT				
gtfD (MAV_3253) Glicosiltransferasa Proteína GtfD	Este gen no se encontró en el genoma de <i>M. colombiense</i> 3035 CECT				
rtfA (MAV_3262) Ramnosiltransferasa Proteína RtfA	MCOL_V218741 Proteína de la familia de glicosiltransferasa ID: EJO86962.1	Contig 00001 Complementaria (51165-52355)	1208	85	0.0
atf (MAV_3274) Acetiltransferasa Proteína Atf	MCOL_V218771 Hipotética Acetiltransferasa ID: EJO86968.1	Contig 00001 complementaria(59477-60640)	808	81	0.0
mbtH (MAV_3245) Función desconocida Proteína hipotética Tipo-MbtH	MCOL_V218611 Proteína hipotética Tipo-MbtH ID: EJO86936.1	Contig 00001 complementaria(19953-20183)	372	96	1e-103
pstA (MAV_3244) Péptido sintetasa no ribosomal Proteína PstA	MCOL_V218606 Péptido sintetasa no ribosomal ID: EJO86935.1	Contig 00001 Complementaria (9653-19858)	11424	87	0.0
pstB (MAV_3243) Péptido sintetasa no ribosomal Proteína PstB	MCOL_V218601 Péptido sintetasa no ribosomal ID: EJO86934.1	Contig 00001 Complementaria(2007-9656)	9631	89	0.0
gap (MAV_3059) Proteína requerida para exportación de GPLs Proteína Gap	MCOL_V222543 Proteína hipotética ID: EJO86736.1	Contig 00007 (86965-87759)	237	82	1e-62
sap (MAV_4518) Proteína asociada a factor sigma	MCOL_V200150 Proteína con dominio DGPF	Contig 00002A (35928..36626)	545	86	2e-155

Proteína Sap	ID: EJO90593.1 MCOL_V200155				
ecf (MAV_4519) RNA polimerasa ECF de la subfamilia de factores sigma Proteína ECF	Hipotética RNA polimerasa ECF de la subfamilia de factores sigma. ID: EJO90594.1 MCOL_V218931	Contig 00002A (36630..37847)	1266	86	0.0
fadE5 (MAV_3309) Acil-CoA Deshidrogenasa Proteína FadE5	Acil-CoA Deshidrogenasa Proteína FadE15 ID: EJO87000.1 MCOL_V208010	Contig 00001 (93583-95409)	2362	90	0.0
Rv0926 (MAV_2461) Función desconocida Proteína hipotética	Función desconocida Proteína hipotética ID: EJO90119.1 MCOL_V205565	Contig 00003A (927060..928142)	1314	89	0.0
pks (MAV_1763) policétido sintetasa Proteína PkS	policétido sintetasa ID: EJO89632.1 MCOL_V205560	Contig 00003A (332140..343203)	7116	79	0.0
papA3 (MAV_1762) Proteína que contiene dominio de condensación, aciltransferasa Proteína PapA3	Proteína que contiene dominio de condensación ID: EJO89631.1 MCOL_V205550	Contig 00003A complementaria(330370..331776)	710	77	0.0
mmpL10 (MAV_1761) Proteína de transporte de la familia MmpL Proteína MmpL10	Proteína de transporte MmpL10 ID: EJO89629.1	Contig 00003A (326135..329125)	399	77	7e-111
fadD23 (MAV_1759) Acil-CoA sintetasa Proteína FadD23	Este gen no se encontró en el genoma de <i>M. colombiense</i> 3035 CECT				
pe (MAV_1760) Función desconocida Proteína hipotética gap-tipo (MAV_1758)	Este gen no se encontró en el genoma de <i>M. colombiense</i> 3035 CECT				
Proteína hipotética integral de membrana dhgA (MAV_3259) Deshidrogenasa DhgA	Este gen no se encontró en el genoma de <i>M. colombiense</i> 3035 CECT				

Anexo C: Transcripción de genes relacionados con la biosíntesis de GPLs.

Figura C-1. Curvas de fluorescencia

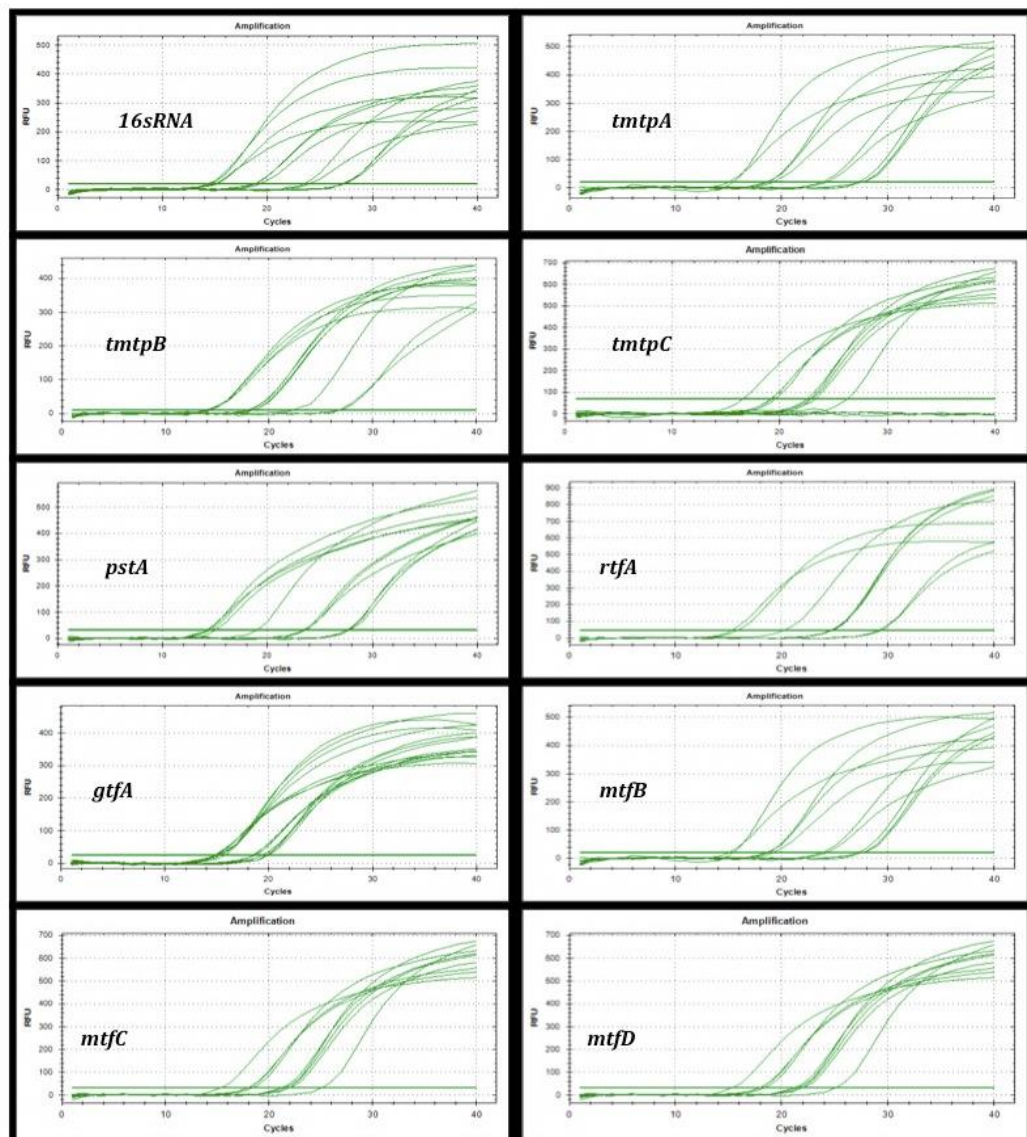


Figura C-2. Curvas de Melting

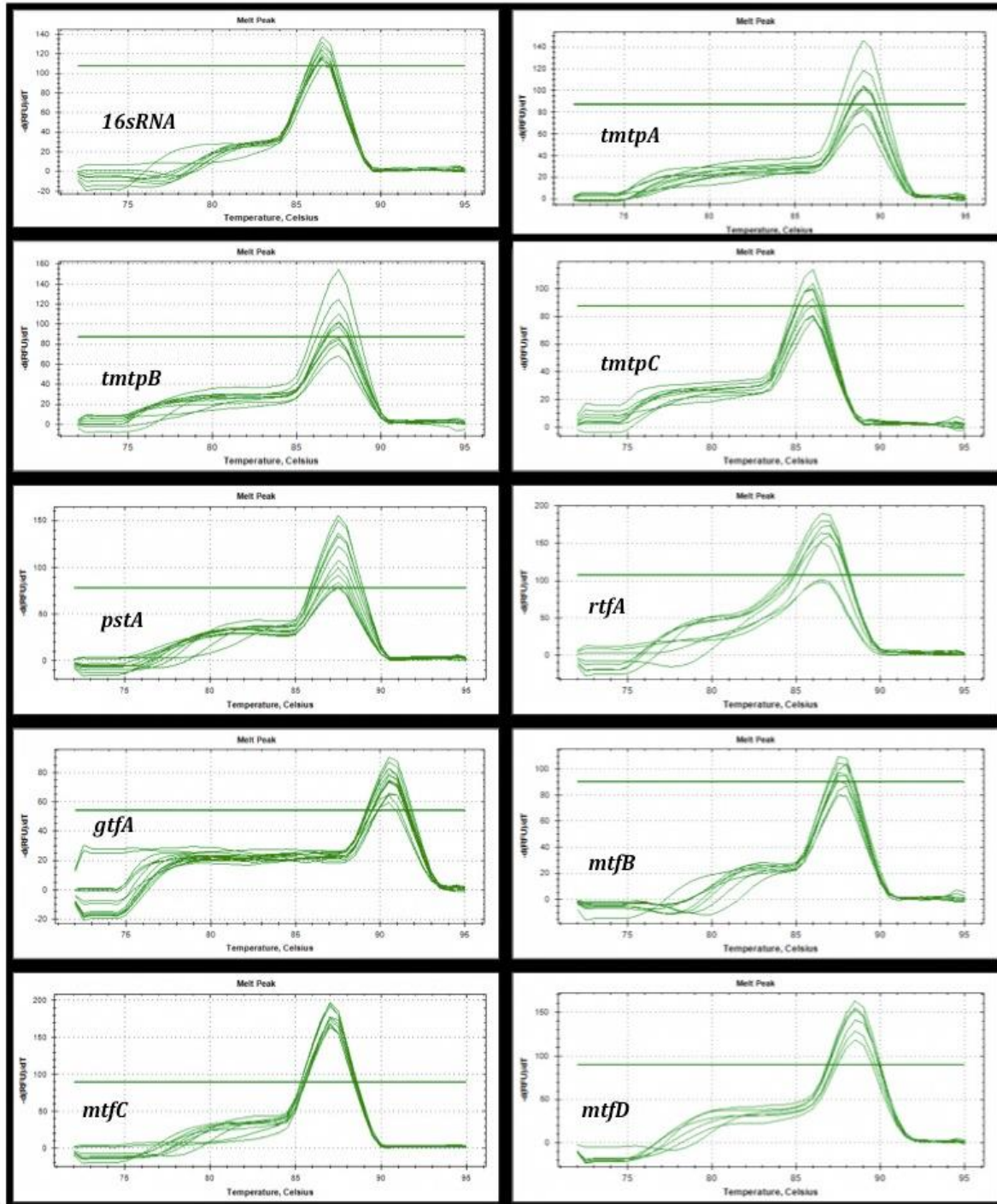
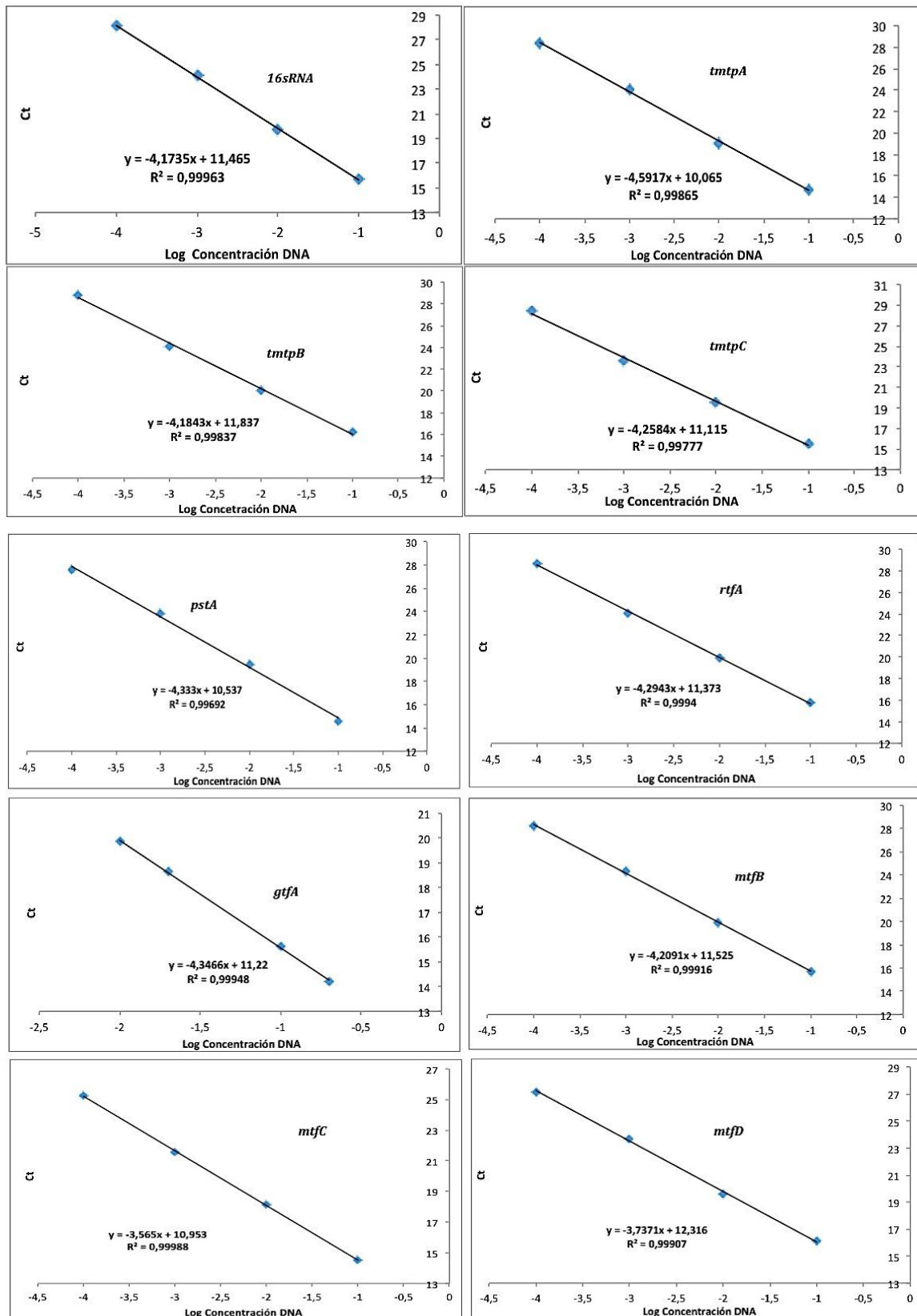


Figura C-3. Curvas de calibración



Bibliografía

- [1] S. Poulin, C. Corbeil, M. Nguyen, A. St-Denis, L. Côté, F. Le Deist, and A. Carignan, "Fatal Mycobacterium colombiense/cytomegalovirus coinfection associated with acquired immunodeficiency due to autoantibodies against interferon gamma: a case report.," *BMC Infect. Dis.*, vol. 13, p. 24, Jan. 2013.
- [2] Ó. Esparcia, F. Navarro, M. Quer, and P. Coll, "Lymphadenopathy Caused by Mycobacterium colombiense," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 46, no. 5, pp. 1885–1887, 2008.
- [3] J. Fujita, "Diagnosis and treatment of pulmonary diseases caused by Mycobacterium avium complex," *Nippon Rinsho*, vol. 69, no. 8, pp. 1451–1457, 2011.
- [4] W. Costerton, R. Veeh, M. Shirtliff, M. Pasmore, C. Post, and G. Ehrlich, "The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections," *J. Clin. Invest.*, vol. 112, no. 10, pp. 1466–1477, 2003.
- [5] A. Muwonge, C. Kankya, T. B. Johansen, B. Djønne, J. Godfroid, D. Biffa, V. Edvardsen, and E. Skjerve, "Non-tuberculous mycobacteria isolated from slaughter pigs in Mubende district, Uganda.," *BMC Vet. Res.*, vol. 8, p. 52, Jan. 2012.
- [6] J. O. Falkinham, "Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment.," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 107, no. 2, pp. 356–367, 2009.
- [7] M. I. Murcia, E. Tortoli, M. C. Menendez, E. Palenque, and M. J. Garcia, "Mycobacterium colombiense sp. nov., a novel member of the Mycobacterium avium complex and description of MAC-X as a new ITS genetic variant.," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 56, no. Pt 9, pp. 2049–54, Sep. 2006.
- [8] O. Esparcia, F. Navarro, M. Quer, and P. Coll, "Lymphadenopathy caused by Mycobacterium colombiense.," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 46, no. 5, pp. 1885–7, May 2008.
- [9] K. Vuorenmaa, I. Ben Salah, V. Barlogis, H. Chambost, and M. Drancourt, "Mycobacterium colombiense and pseudotuberculous lymphadenopathy," *Emerg Infect Dis*, vol. 15, no. 4, pp. 618–20, 2009.
- [10] S. Cohen-Bacrie, M. David, N. Stremier, J.-C. Dubus, J.-M. Rolain, and M. Drancourt, "Mycobacterium chimaera pulmonary infection complicating cystic fibrosis: a case report.," *J. Med. Case Rep.*, vol. 5, no. 1, p. 473, Jan. 2011.
- [11] R. G. Kansal, R. Gomez-Flores, and R. T. Mehta, "Change in colony morphology influences the virulence as well as the biochemical properties of the Mycobacterium avium complex.," *Microb. Pathog.*, vol. 25, no. 4, pp. 203–214, 1998.

- [12] J. Recht, A. Martínez, S. Torello, and R. Kolter, "Genetic analysis of sliding motility in *Mycobacterium smegmatis*," *J. Bacteriol.*, vol. 182, no. 15, pp. 4348–4351, 2000.
- [13] A. Martínez, S. Torello, and R. Kolter, "Sliding motility in mycobacteria," *J. Bacteriol.*, vol. 181, no. 23, pp. 7331–7338, 1999.
- [14] G. Carter, M. Wu, D. C. Drummond, and L. E. Bermudez, "Characterization of biofilm formation by clinical isolates of *Mycobacterium avium*," *J. Med. Microbiol.*, vol. 52, no. Pt 9, pp. 747–752, 2003.
- [15] J. S. Schorey and L. Sweet, "The mycobacterial glycopeptidolipids: structure, function, and their role in pathogenesis," *Glycobiology*, vol. 18, no. 11, pp. 832–41, 2008.
- [16] R. JM. Deshayes, C., Kocíncová, D., Etienne, G., "Glycopeptidolipids: a complex pathway for Small pleiotropic Molecules," in in *The Mycobacterial Cell Envelope*, ASM, Press., M. Daffé and J.-M. Reytrat, Eds. Washington, DC, 2008, pp. 345–360.
- [17] L. Pang, X. Tian, W. Pan, and J. Xie, "Structure and function of mycobacterium glycopeptidolipids from comparative genomics perspective," *J. Cell. Biochem.*, vol. 114, no. 8, pp. 1705–1713, Feb. 2013.
- [18] N. A. Gómez, "[Non-tuberculous mycobacteria: an emerging disease?]," *An. Pediatr. (Barc)*, vol. 71, no. 3, pp. 185–8, Sep. 2009.
- [19] V. M. Katoch, "Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM)," *Indian J. Med. Res.*, vol. 120, no. 4, pp. 290–304, Oct. 2004.
- [20] S. J. Shin, B. S. Lee, W.-J. Koh, E. J. B. Manning, K. Anklam, S. Sreevatsan, R. S. Lambrecht, and M. T. Collins, "Efficient Differentiation of *Mycobacterium avium* Complex Species and Subspecies by Use of Five-Target Multiplex PCR," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 48, no. 11, pp. 4057–4062, 2010.
- [21] J. P. Euzéby, "No Title," *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*, 1997. [Online]. Available: <http://www.bacterio.cict.fr/index.html>. [Accessed: 25-Apr-2013].
- [22] E. C. Hett and E. J. Rubin, "Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective," *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR*, vol. 72, no. 1, pp. 126–156, 2008.
- [23] N. Rastogi, E. Legrand, and C. Sola, "The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis," *Rev. Sci. Tech.*, vol. 20, no. 1, pp. 21–54, Apr. 2001.
- [24] C. L. Cosma, D. R. Sherman, and L. Ramakrishnan, "THE SECRET LIVES OF THE PATHOGENIC MYCOBACTERIA - Annual Review of Microbiology, 57(1):641 - Abstract," *Annual Review of Microbiology*, vol. 57, pp. 641–76, 2003.
- [25] P. R. Murray, *Microbiología médica*, vol. 7, no. 5. Elsevier España, 2005, p. 927.
- [26] F. C. Tomashefski J., "Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections," in in *Dail and Hammar's Pulmonary Pathology*, 3rd ed., Springer, Ed. Ciudad New York, USA, 2008, pp. 316–348.

-
- [27] A. F. Cunningham and C. L. Spreadbury, "Mycobacterial Stationary Phase Induced by Low Oxygen Tension : Cell Wall Thickening and Localization of the 16-Kilodalton α -Crystallin Homolog," *Microbiology*, vol. 180, no. 4, pp. 801–808, 1998.
- [28] V. V Lévy-Frébault and F. Portaels, "Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species.," *Int. J. Syst. Bacteriol.*, vol. 42, no. 2, pp. 315–323, 1992.
- [29] M. Daffé, "The Global Architecture of the Mycobacterial Cell Envelope," in in *The Mycobacterial Cell Envelope*, ASM Press., M. Daffé and J.-M. Reyrat, Eds. Washington, DC, 2008, pp. 3–23.
- [30] L. Dover, L. Alderwick, W. Bhowryth, A. Brown, L. Kremer, and G. Besra, "Antibiotics and New Inhibitors of the Cell Wall," in in *The Mycobacterial Cell Envelope*, ASM Press., M. Daffé and J.-M. Reyrat, Eds. Washington, DC, 2008, pp. 107–131.
- [31] G. E. Pfyffer, "Resistance to antimicrobial agents in *Mycobacterium tuberculosis*.,," *Acta Cient. Venez.*, vol. 52 Suppl 1, pp. 36–39, 2001.
- [32] M. L. R. Rossetti, A. R. D. M. Valim, M. S. N. Silva, and V. S. Rodrigues, "Resistant tuberculosis: a molecular review," *Rev. Saude Publica*, vol. 36, no. 4, pp. 525–532, 2002.
- [33] C. R. E. McEvoy, A. A. Falmer, N. C. Gey Van Pittius, T. C. Victor, P. D. Van Helden, and R. M. Warren, "The role of IS6110 in the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*.,," *Tuberc. Edinburgh Scotl.*, vol. 87, no. 5, pp. 393–404, 2007.
- [34] R. Issa, N. A. Mohd Hassan, H. Abdul, S. H. Hashim, V. H. Seradja, and A. Abdul Sani, "Detection and discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex.,," *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 72, no. 1, pp. 62–67, 2011.
- [35] D. V Cousins, R. Bastida, A. Cataldi, V. Quse, S. Redrobe, S. Dow, P. Duignan, A. Murray, C. Dupont, N. Ahmed, D. M. Collins, W. R. Butler, D. Dawson, D. Rodríguez, J. Loureiro, M. I. Romano, A. Alito, M. Zumarraga, and A. Bernardelli, "Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov.,," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 53, no. Pt 5, pp. 1305–1314, 2003.
- [36] C. J. Palgrave, L. Benato, K. Eatwell, I. F. Laurensen, and N. H. Smith, "Mycobacterium microti infection in two meerkats (*Suricata suricatta*).," *J. Comp. Pathol.*, vol. 146, no. 2–3, pp. 278–82, 2012.
- [37] E. Tortoli, "The new mycobacteria: an update.,," *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, vol. 48, no. 2, pp. 159–78, Nov. 2006.
- [38] A. Aranaz, E. Liebana, E. Gomez-Mampaso, J. C. Galan, D. Cousins, A. Ortega, J. Blazquez, F. Baquero, A. Mateos, G. Suarez, and L. Dominguez, "Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain.,," *Int. J. Syst. Bacteriol.*, vol. 49 Pt 3, pp. 1263–1273, 1999.
- [39] S. Niemann, E. Richter, and S. Rüsche-Gerdes, "Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. caprae Aranaz et al. 1999 to the species *Mycobacterium bovis* Karlson and Lessel 1970 (approved lists 1980) as *Mycobacterium*

- bovis subsp. caprae comb. nov.," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 52, no. Pt 2, pp. 433–6, Mar. 2002.
- [40] A. Aranaz, D. Cousins, A. Mateos, and L. Domínguez, "Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. caprae Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov.," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 53, no. Pt 6, pp. 1785–1789, 2003.
- [41] National-Center-for-Biotechnology-Information 26/04/2013, "National-Center-for-Biotechnology-Information." [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=77643>. [Accessed: 26-Apr-2013].
- [42] R. Hazra, M. M. Floyd, A. Sloutsky, and R. N. Husson, "Novel *Mycobacterium* Related to *Mycobacterium triplex* as a Cause of Cervical Lymphadenitis," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 39, no. 4, pp. 1227–1230, 2001.
- [43] S. K. Field, D. Fisher, and R. L. Cowie, "review *Mycobacterium avium* complex Pulmonary Disease in Patients Without HIV Infection *," *Chest*, no. 126, pp. 566–581, 2004.
- [44] K. Watanabe, M. Fujimura, K. Kasahara, M. Yasui, S. Myou, A. Watanabe, and S. Nakao, "Characteristics of pulmonary *Mycobacterium avium*-intracellulare complex (MAC) infection in comparison with those of tuberculosis.," *Respir. Med.*, vol. 97, no. 6, pp. 654–659, 2003.
- [45] E. Hagiwara, S. Komatsu, R. Nishihira, T. Shinohara, T. Baba, and T. Ogura, "Clinical characteristics and prevalence of pneumothorax in patients with pulmonary *Mycobacterium avium* complex disease.," *J. Infect. Chemother.*, pp. 16–20, Nov. 2012.
- [46] E. Tortoli, L. Rindi, M. J. Garcia, P. Chiaradonna, R. Dei, C. Garzelli, R. M. Kroppenstedt, N. Lari, R. Mattei, A. Mariottini, G. Mazzarelli, M. I. Murcia, A. Nanetti, P. Piccoli, and C. Scarparo, "Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the *Mycobacterium avium* complex, to species rank as *Mycobacterium chimaera* sp. nov.," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 54, no. Pt 4, pp. 1277–1285, 2004.
- [47] I. Ben Salah, C. Cayrou, D. Raoult, and M. Drancourt, "*Mycobacterium marseillense* sp. nov., *Mycobacterium timonense* sp. nov. and *Mycobacterium bouchedurhonense* sp. nov., members of the *Mycobacterium avium* complex.," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 59, no. Pt 11, pp. 2803–2808, 2009.
- [48] J. Van Ingen, M. J. Boeree, K. Kösters, A. Wieland, E. Tortoli, P. N. R. Dekhuijzen, and D. Van Soolingen, "Proposal to elevate *Mycobacterium avium* complex ITS sequevar MAC-Q to *Mycobacterium vulneris* sp. nov.," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 59, no. Pt 9, pp. 2277–2282, 2009.
- [49] D. Bang, T. Herlin, M. Stegger, A. B. Andersen, P. Torkko, E. Tortoli, and V. O. Thomsen, "*Mycobacterium arosiense* sp. nov., a slowly growing, scotochromogenic species causing osteomyelitis in an immunocompromised child.," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 58, no. Pt 10, pp. 2398–2402, 2008.
- [50] C. Cayrou, C. Turenne, M. A. Behr, and M. Drancourt, "Genotyping of *Mycobacterium avium* complex organisms using multispacer sequence typing.," *Microbiology*, vol. 156, no. Pt 3, pp. 687–694, 2010.

-
- [51] S. C. Smole, F. McAleese, J. Ngampasutadol, C. F. Von Reyn, and R. D. Arbeit, "Clinical and epidemiological correlates of genotypes within the *Mycobacterium avium* complex defined by restriction and sequence analysis of hsp65.," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 40, no. 9, pp. 3374–3380, 2002.
- [52] N. Radomski, V. C. Thibault, C. Karoui, K. De Cruz, T. Cochard, C. Gutiérrez, P. Supply, F. Biet, and M. L. Boschirol, "Determination of Genotypic Diversity of *Mycobacterium avium* Subspecies from Human and Animal Origins by *Mycobacterial Interspersed Repetitive-Unit-Variable-Number Tandem-Repeat* and *IS1311* Restriction Fragment Length Polymorphism Typing Methods," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 48, no. 4, pp. 1026–1034, 2010.
- [53] M. Thorel, M. Krichevsky, and V. Lévy-Frébault, "Numerical Taxonomy of *Mycobacterium*-Dependent *Mycobacteria*, Emended Description of *Mycobacterium avium*, and Description of," *Int. J. Syst. Bacteriol.*, vol. 40, no. 3, pp. 254–260, 1990.
- [54] J. B. Torrelles, D. Ellis, T. Osborne, A. Hoefer, I. M. Orme, D. Chatterjee, P. J. Brennan, and A. M. Cooper, "Characterization of virulence, colony morphotype and the glycopeptidolipid of *Mycobacterium avium* strain 104.," *Tuberc. Edinburgh Scotl.*, vol. 82, no. 6, pp. 293–300, 2002.
- [55] W. W. Barrow and P. J. Brennan, "Isolation in high frequency of rough variants of *Mycobacterium intracellulare* lacking C-mycoside glycopeptidolipid antigens.," *J. Bacteriol.*, vol. 150, no. 1, pp. 381–384, 1982.
- [56] C. L. Woodley and H. L. David, "Effect of Temperature on the Rate of the Transparent to Opaque Colony Type Transition in *Mycobacterium avium*," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 9, no. 1, pp. 113–119, 1976.
- [57] D. Chatterjee and K. H. Khoo, "The surface glycopeptidolipids of mycobacteria: structures and biological properties.," *Cell. Mol. life Sci. C.*, vol. 58, no. 14, pp. 2018–2042, 2001.
- [58] J. . Torrelles, D. Ellis, T. Osborne, a Hoefer, I. . Orme, D. Chatterjee, P. . Brennan, and a . Cooper, "Characterization of virulence, colony morphotype and the glycopeptidolipid of *Mycobacterium avium* strain 104," *Tuberculosis*, vol. 82, no. 6, pp. 293–300, Oct. 2002.
- [59] D. Chatterjee, S. W. Hunter, M. McNeil, I. Jardine, and P. J. Brennan, "Structure and function of mycobacterial glycolipids and glycopeptidolipids.," *Acta Leprol.*, vol. 7 Suppl 1, no. Suppl 1, pp. 81–84, 1989.
- [60] J. Leguizamón, J. Hernández, M.-I. Murcia, and C.-Y. Soto, "Identification of potential biomarkers to distinguish *Mycobacterium colombiense* from other mycobacterial species.," *Mol. Cell. Probes*, vol. 27, no. 1, pp. 46–52, Feb. 2013.
- [61] M. González-Pérez, M. I. Murcia, D. Landsman, I. K. Jordan, and L. Mariño-Ramírez, "Genome Sequence of the *Mycobacterium colombiense* Type Strain, CECT 3035.," *J. Bacteriol.*, vol. 193, no. 20, pp. 5866–7, 2011.
- [62] M. Daffé and P. Draper, "The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity.," *Adv. Microb. Physiol.*, vol. 39, no. 0065–2911 (Print), pp. 131–203, 1998.

- [63] G. S. Besra, C. B. Morehouse, C. M. Rittner, C. J. Waechter, and P. J. Brennan, "Biosynthesis of mycobacterial lipoarabinomannan.," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 29, pp. 18460–18466, 1997.
- [64] M. Daffé and G. Etienne, "The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity.," *Tuberc. lung Dis. Off. J. Int. Union against Tuberc. Lung Dis.*, vol. 79, no. 3, pp. 153–169, 1999.
- [65] K. G. Mawuenyega, C. V Forst, K. M. Dobos, J. T. Belisle, J. Chen, E. M. Bradbury, A. R. M. Bradbury, and X. Chen, "Mycobacterium tuberculosis functional network analysis by global subcellular protein profiling.," *Mol. Biol. Cell*, vol. 16, no. 1, pp. 396–404, 2005.
- [66] L. W. Riley, "Of mice, men, and elephants: *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and pathogenesis," *J. Clin. Invest.*, vol. 116, no. 6, pp. 1475–1478, 2006.
- [67] P. J. Brennan, "Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*.,," *Tuberc. Edinburgh Scotl.*, vol. 83, no. 1–3, pp. 91–97, 2003.
- [68] J. Asselineau and G. Lanéelle, "Mycobacterial lipids: a historical perspective.," *Front. Biosci. a J. virtual Libr.*, vol. 3, pp. e164–e174, 1998.
- [69] J. Liu, C. E. Barry, G. S. Besra, and H. Nikaido, "Mycolic acid structure determines the fluidity of the mycobacterial cell wall.," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 47, pp. 29545–29551, 1996.
- [70] C. Y. Soto, M. Cama, I. Gibert, and M. Luquin, "Application of an easy and reliable method for sulfolipid-I detection in the study of its distribution in *Mycobacterium tuberculosis* strains.," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 187, no. 1, pp. 103–107, 2000.
- [71] S. Secanella-Fandos, M. Luquin, M. Pérez-Trujillo, and E. Julián, "Revisited mycolic acid pattern of *Mycobacterium confluentis* using thin-layer chromatography.," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 879, no. 26, pp. 2821–2826, 2011.
- [72] M. Luquin, V. Ausina, F. López Calahorra, F. Belda, M. García Barceló, C. Celma, and G. Prats, "Evaluation of practical chromatographic procedures for identification of clinical isolates of mycobacteria.," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 29, no. 1, pp. 120–130, 1991.
- [73] A. Ortalo-Magné, M. A. Dupont, A. Lemassu, A. B. Andersen, P. Gounon, and M. Daffé, "Molecular composition of the outermost capsular material of the tubercle bacillus.," *Microbiology*, vol. 141 (Pt 7, no. 7, pp. 1609–1620, 1995.
- [74] I. Vergne and M. Daffé, "Interaction of mycobacterial glycolipids with host cells.," *Front. Biosci. a J. virtual Libr.*, vol. 3, no. 1, pp. d865–d876, 1998.
- [75] T. Panichakul, J. Sattabongkot, K. Chotivanich, J. Sirichaisinthop, L. Cui, and R. Udomsangpetch, "Production of erythropoietic cells in vitro for continuous culture of *Plasmodium vivax*.,," *Int. J. Parasitol.*, vol. 37, no. 14, pp. 1551–7, Dec. 2007.
- [76] R. Mukherjee and D. Chatterji, "Glycopeptidolipids: immuno-modulators in greasy mycobacterial cell envelope.," *IUBMB Life*, vol. 64, no. 3, pp. 215–25, 2012.

-
- [77] H. Billman-Jacobe, M. J. McConville, R. E. Haites, S. Kovacevic, and R. L. Coppel, "Identification of a peptide synthetase involved in the biosynthesis of glycopeptidolipids of *Mycobacterium smegmatis*," *Mol. Microbiol.*, vol. 33, no. 6, pp. 1244–1253, 1999.
- [78] F. Ripoll, C. Deshayes, S. Pasek, F. Laval, J.-L. Beretti, F. Biet, J.-L. Risler, M. Daffé, G. Etienne, J.-L. Gaillard, and J.-M. Reyrat, "Genomics of glycopeptidolipid biosynthesis in *Mycobacterium abscessus* and *M. chelonae*," *BMC Genomics*, vol. 8, p. 114, Jan. 2007.
- [79] B. Sondén, D. Kocíncová, C. Deshayes, D. Euphrasie, L. Rhayat, F. Laval, C. Frehel, M. Daffé, G. Etienne, and J.-M. Reyrat, "Gap, a mycobacterial specific integral membrane protein, is required for glycolipid transport to the cell surface," *Mol. Microbiol.*, vol. 58, no. 2, pp. 426–440, 2005.
- [80] E. Tatham, S. Sundaram Chavadi, P. Mohandas, U. R. Edupuganti, S. K. Angala, D. Chatterjee, and L. E. N. Quadri, "Production of mycobacterial cell wall glycopeptidolipids requires a member of the MbtH-like protein family," *BMC Microbiol.*, vol. 12, no. 1, p. 118, Jan. 2012.
- [81] R. Freeman, H. Geier, K. M. Weigel, J. Do, T. E. Ford, and G. a Cangelosi, "Roles for cell wall glycopeptidolipid in surface adherence and planktonic dispersal of *Mycobacterium avium*," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 72, no. 12, pp. 7554–8, Dec. 2006.
- [82] Y. Miyamoto, T. Mukai, N. Nakata, Y. Maeda, M. Kai, T. Naka, I. Yano, and V. Makino, "Identification and Characterization of the Genes Involved in Glycosylation Pathways of Mycobacterial Glycopeptidolipid Biosynthesis," *J Bacteriol*, vol. 188, pp. 86–95, 2006.
- [83] T. M. Eckstein, F. S. Silbaq, D. Chatterjee, N. J. Kelly, P. J. Brennan, and J. T. Belisle, "Identification and recombinant expression of a *Mycobacterium avium* rhamnosyltransferase gene (*rtfA*) involved in glycopeptidolipid biosynthesis," *J. Bacteriol.*, vol. 180, no. 21, pp. 5567–5573, 1998.
- [84] T. M. Eckstein, "Proposed pathway for the biosynthesis of serovar-specific glycopeptidolipids in *Mycobacterium avium* serovar 2," *Microbiology*, vol. 149, no. 10, pp. 2797–2807, Oct. 2003.
- [85] J. N. Maslow, V. R. Irani, S.-H. Lee, T. M. Eckstein, J. M. Inamine, and J. T. Belisle, "Biosynthetic specificity of the rhamnosyltransferase gene of *Mycobacterium avium* serovar 2 as determined by allelic exchange mutagenesis," *Microbiology*, vol. 149, no. Pt 11, pp. 3193–3202, 2003.
- [86] Y. Miyamoto, T. Mukai, Y. Maeda, N. Nakata, M. Kai, T. Naka, I. Yano, and M. Makino, "Characterization of the fucosylation pathway in the biosynthesis of glycopeptidolipids from *Mycobacterium avium* complex," *J. Bacteriol.*, vol. 189, no. 15, pp. 5515–22, Aug. 2007.
- [87] Y. Miyamoto, T. Mukai, Y. Maeda, M. Kai, T. Naka, I. Yano, and M. Makino, "The *Mycobacterium avium* complex *gtfTB* gene encodes a glucosyltransferase required for the biosynthesis of serovar 8-specific glycopeptidolipid," *J. Bacteriol.*, vol. 190, no. 24, pp. 7918–7924, 2008.
- [88] J. H. Patterson, M. J. McConville, R. E. Haites, R. L. Coppel, and H. Billman-Jacobe, "Identification of a methyltransferase from *Mycobacterium smegmatis* involved in glycopeptidolipid synthesis," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 32, pp. 24900–24906, 2000.

- [89] D. Jeevarajah, J. H. Patterson, E. Taig, T. Sargeant, M. J. McConville, and H. Billman-Jacobe, "Methylation of GPLs in *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium avium*," *J. Bacteriol.*, vol. 186, no. 20, pp. 6792–6799, 2004.
- [90] D. Jeevarajah, J. H. Patterson, M. J. McConville, and H. Billman-Jacobe, "Modification of glycopeptidolipids by an O-methyltransferase of *Mycobacterium smegmatis*," *Microbiology*, vol. 148, no. Pt 10, pp. 3079–3087, 2002.
- [91] E. Krzywinska, S. Bhatnagar, L. Sweet, D. Chatterjee, and J. S. Schorey, "Mycobacterium avium 104 deleted of the methyltransferase D gene by allelic replacement lacks serotype-specific glycopeptidolipids and shows attenuated virulence in mice," *Mol. Microbiol.*, vol. 56, no. 5, pp. 1262–1273, 2005.
- [92] C. Deshayes, H. Bach, D. Euphrasie, R. Attarian, M. Coureuil, W. Sougakoff, F. Laval, Y. Av-Gay, M. Daffé, G. Etienne, and J.-M. Reytrat, "MmpS4 promotes glycopeptidolipids biosynthesis and export in *Mycobacterium smegmatis*," *Mol. Microbiol.*, vol. 78, no. 4, pp. 989–1003, 2010.
- [93] D. Kocíncová, A. K. Singh, J.-L. Beretti, H. Ren, D. Euphrasie, J. Liu, M. Daffé, G. Etienne, and J.-M. Reytrat, "Spontaneous transposition of IS1096 or ISMsm3 leads to glycopeptidolipid overproduction and affects surface properties in *Mycobacterium smegmatis*," *Tuberc. Edinburgh Scotl.*, vol. 88, no. 5, pp. 390–398, 2008.
- [94] G. Etienne, C. Villeneuve, H. Billman-Jacobe, C. Astarie-Dequeker, M.-A. Dupont, and M. Daffé, "The impact of the absence of glycopeptidolipids on the ultrastructure, cell surface and cell wall properties, and phagocytosis of *Mycobacterium smegmatis*," *Microbiology*, vol. 148, no. Pt 10, pp. 3089–3100, 2002.
- [95] C. Deshayes, F. Laval, H. Montrozier, M. Daffé, G. Etienne, and J.-M. Reytrat, "A Glycosyltransferase Involved in Biosynthesis of Triglycosylated Glycopeptidolipids in *Mycobacterium smegmatis*: Impact on Surface Properties," *J. Bacteriol.*, vol. 187, no. 21, pp. 7283–7291, 2005.
- [96] J. Recht and R. Kolter, "Glycopeptidolipid acetylation affects sliding motility and biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis*," *J. Bacteriol.*, vol. 183, no. 19, pp. 5718–5724, 2001.
- [97] Y. Yamazaki, L. Danelishvili, M. Wu, M. Macnab, and L. E. Bermudez, "Mycobacterium avium Genes Associated with the Ability To Form a Biofilm," vol. 72, no. 1, pp. 819–825, 2006.
- [98] J. Henrichsen, "Bacterial surface translocation: a survey and a classification," *Bacteriol. Rev.*, vol. 36, no. 4, pp. 478–503, Dec. 1972.
- [99] G. O'Toole, H. B. Kaplan, and R. Kolter, "Biofilm formation as microbial development," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 54, no. 1, pp. 49–79, 2000.
- [100] Z. Lewandowski, "Structure and Function of Biofilms," in *Biofilms Recent Advances in Their Study and Control*, L. Evans, Ed. harwood academic publishers, 2000, pp. 1–17.
- [101] L. Hall-Stoodley and P. Stoodley, "Evolving concepts in biofilm infections," *Cell. Microbiol.*, vol. 11, no. 7, pp. 1034–1043, 2009.

-
- [102] A. K. Ojha, A. D. Baughn, D. Sambandan, T. Hsu, X. Trivelli, Y. Guerardel, A. Alahari, L. Kremer, W. R. Jacobs, and G. F. Hatfull, "Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria," *Mol. Microbiol.*, vol. 69, no. 1, pp. 164–174, 2008.
- [103] P. S. Stewart and M. J. Franklin, "Physiological heterogeneity in biofilms.," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 6, no. 3, pp. 199–210, 2008.
- [104] M. M. Zambrano and R. Kolter, "Mycobacterial biofilms: a greasy way to hold it together.," *Cell*, vol. 123, no. 5, pp. 762–764, 2005.
- [105] R. Freeman, H. Geier, K. M. Weigel, J. Do, T. E. Ford, and G. A. Cangelosi, "Roles for Cell Wall Glycopeptidolipid in Surface Adherence and Planktonic Dispersal of *Mycobacterium avium*," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 72, no. 12, pp. 7554–7558, 2006.
- [106] A. Ojha, M. Anand, A. Bhatt, L. Kremer, W. R. Jacobs, and G. F. Hatfull, "GroEL1: a dedicated chaperone involved in mycolic acid biosynthesis during biofilm formation in mycobacteria.," *Cell*, vol. 123, no. 5, pp. 861–873, 2005.
- [107] S. B. Snapper, R. E. Melton, S. Mustafa, T. Kieser, and W. R. Jacobs, "Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*.,," *Mol. Microbiol.*, vol. 4, no. 11, pp. 1911–1919, 1990.
- [108] K. L. Horan, R. Freeman, K. Weigel, M. Semret, S. Pfaller, T. C. Covert, D. Van Soolingen, S. C. Leão, M. A. Behr, and G. A. Cangelosi, "Isolation of the Genome Sequence Strain *Mycobacterium avium* 104 from Multiple Patients over a 17-Year Period," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 44, no. 3, pp. 783–789, 2006.
- [109] E. Tugrul, T., Cansunar, "Detecting surfactant-producing microorganisms by the drop-collapse test.," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 21, pp. 851–853, 2005.
- [110] N. M. Parrish, C. G. Ko, J. D. Dick, P. B. Jones, and J. L. E. Ellingson, "Growth, Congo Red Agar Colony Morphotypes and Antibiotic Susceptibility Testing of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis," *Clin. Med. Res.*, vol. 2, no. 2, pp. 107–114, 2004.
- [111] M. Muñoz, M. A. Lanéeelle, M. Luquin, J. Torrelles, E. Julián, V. Ausina, and M. Daffé, "Occurrence of an antigenic triacyl trehalose in clinical isolates and reference strains of *Mycobacterium tuberculosis*.,," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 157, no. 2, pp. 251–259, 1997.
- [112] P. Helden, T. Victor, R. Warren, and E. Helden, "Isolation of DNA from *Mycobacterium tuberculosis*," in in *Mycobacterium tuberculosis protocols*, 2nd ed., Humana Press, Ed. New Jersey, USA., 2001.
- [113] J. C. Van Kessel, L. J. Marinelli, and G. F. Hatfull, "Recombineering mycobacteria and their phages.," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 6, no. 11, pp. 851–857, 2008.
- [114] J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor laboratory press. Cold Spring Harbor, 1989, pp. 931–957.
- [115] J. Sambrook and D. W. Russell, *Molecular cloning*, vol. 18, no. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, pp. Vol.3 16.7–16.33, 17.3–17.16, Vol 1 4.46–4.70.

- [116] J. C. Betts, P. T. Lukey, L. C. Robb, R. A. McAdam, and K. Duncan, "Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling.," *Mol. Microbiol.*, vol. 43, no. 3, pp. 717–731, 2002.
- [117] "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi." [Online]. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi. [Accessed: 25-May-2013].
- [118] M.-F. Thorel and H. L. David, "Specific surface antigens of SmT variants of *Mycobacterium avium*," *Infect. Immun.*, vol. 43, no. 1, pp. 438–439, 1984.
- [119] S. Prinzis, B. Rivoire, and P. J. Brennan, "Search for the molecular basis of morphological variation in *Mycobacterium avium*," *Infect. Immun.*, vol. 62, no. 5, pp. 1946–1951, 1994.
- [120] P. Draper, "The mycoside capsule of *Mycobacterium avium* 357," *J. Gen. Microbiol.*, vol. 83, pp. 431–433., 1974.
- [121] E. D. Hilborn, T. C. Covert, M. A. Yakus, S. I. Harris, S. F. Donnelly, E. W. Rice, S. Toney, S. A. Bailey, and G. N. Stelma, "Persistence of Nontuberculous *Mycobacteria* in a Drinking Water System after Addition of Filtration Treatment," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 72, no. 9, pp. 5864–5869, 2006.
- [122] Y. Yamazaki, L. Danelishvili, M. Wu, E. Hidaka, T. Katsuyama, B. Stang, M. Petrofsky, R. Bildfell, and L. E. Bermudez, "The ability to form biofilm influences *Mycobacterium avium* invasion and translocation of bronchial epithelial cells.," *Cell. Microbiol.*, vol. 8, no. 5, pp. 806–814, 2006.
- [123] L. E. O. Eberl and S. Molin, "MINIREVIEW Surface Motility of *Serratia liquefaciens* MG1," *J. Bacteriol.*, vol. 181, no. 6, pp. 1703–1712, 1999.
- [124] T. R. Neu, "Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces.," *Microbiol. Rev.*, vol. 60, no. 1, pp. 151–166, 1996.
- [125] D. K. Jain, D. L. Collins-Thompson, H. Lee, and J. T. Trevors, "A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms.," *J Microbiol Methods*, vol. 13, no. 4, pp. 271–279, 1991.
- [126] A. A. Bodour and R. M. Miller-maier, "Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms," *J. Microbiol. Methods*, vol. 32, no. 3, pp. 273–280, 1998.
- [127] D. López, H. Vlamakis, and R. Kolter, "Biofilms.," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 2, no. 7, p. a000398, Jul. 2010.
- [128] P. J. Brennan, M. Heifets, and B. P. Ullom, "Thin-layer chromatography of lipid antigens as a means of identifying nontuberculous mycobacteria.," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 15, no. 3, pp. 447–455, 1982.
- [129] G. Etienne, F. Laval, C. Villeneuve, P. Dinadayala, A. Abouwarda, D. Zerbib, A. Galamba, and M. Daffé, "The cell envelope structure and properties of *Mycobacterium smegmatis* mc(2)155: is there a clue for the unique transformability of the strain?," *Microbiology*, vol. 151, no. Pt 6, pp. 2075–2086, 2005.

- [130] J. Deshayes, C., Kocíncová, D., Etienne, G., Reyat, "Glycopeptidolipids: a complex pathway for Small pleiotropic Molecules.," in in *The Mycobacterial Cell Envelope.*, 2008, p. Capítulo 21;pag 345–360.
- [131] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.," *Methods San Diego Calif*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, 2001.
- [132] J. Costa, "Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real," *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, vol. 22, no. 5, pp. 299–305, 2004.